



**HAL**  
open science

# Physique des membranes actives : Mesure de spectres de fluctuations.

Moulay Driss El Alaoui Faris

► **To cite this version:**

Moulay Driss El Alaoui Faris. Physique des membranes actives : Mesure de spectres de fluctuations.. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : 2008PA066041 . tel-00812019

**HAL Id: tel-00812019**

**<https://theses.hal.science/tel-00812019>**

Submitted on 11 Apr 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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

*Spécialité :*

PHYSIQUE DES SOLIDES ET MATIÈRE CONDENSÉE

*Présentée par*

**Moulay Driss EL ALAOUI FARIS**

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE

*Sujet de la thèse :*

**Physique des membranes actives :  
Mesure de spectres de fluctuations.**

*Thèse soutenue le XXXX devant le jury composé de*

M. Loïc AUVRAY

Mme. Patricia BASSEREAU

Mme. Martine BEN AMAR

M. Hans-Günter DÖBEREINER

M. Bertrand FOURCADE

M. David LACOSTE

Mme. Laurence SALOME

Directrice de thèse

Rapporteur

Invité

Rapporteur



---

# Table des matières

---

<b>Introduction.</b>	<b>13</b>
<b>1 Les membranes biologiques</b>	<b>15</b>
1.1 Rôles de la membrane dans l'organisation cellulaire . . . . .	16
1.1.1 Compartimentalisation fonctionnelle et organelles . . . . .	16
1.1.2 Transport cellulaire . . . . .	17
1.1.3 Membrane plasmique . . . . .	19
1.2 Physico-chimie et auto-organisation des lipides . . . . .	21
1.2.1 Composition lipidique des membranes cellulaires . . . . .	21
1.2.2 Membranes lipidiques homogènes . . . . .	23
1.2.3 Mélange lipidique mimant la composition des "Rafts" . . . . .	25
1.3 Les protéines membranaires . . . . .	27
1.3.1 Les pompes et les transporteurs transmembranaires . . . . .	28
1.3.2 Les canaux ioniques . . . . .	30
<b>2 Les membranes lipidiques à l'équilibre</b>	<b>33</b>
2.1 Modélisation théorique des membranes lipidiques à l'équilibre . . . . .	34
2.1.1 Propriétés mécaniques des membranes . . . . .	34
2.1.2 Hamiltonien de Helfrich . . . . .	37
2.2 Fluctuations des membranes et leurs implications . . . . .	38
2.2.1 Spectre de fluctuations . . . . .	40
2.2.2 Excès d'aire et tension entropique . . . . .	40
2.3 Méthodes de mesure des propriétés physiques des membranes . . . . .	41
2.3.1 Aspiration par micropipettes . . . . .	42
2.3.2 Extraction de tubes membranaires . . . . .	42

2.3.3	Reconnaissance et analyse de contours . . . . .	43
2.3.4	Microrhéologie sur membrane . . . . .	44
2.3.5	Mesure par microscopie confocale . . . . .	45
2.3.6	Microscopie par interférence de fluorescence (FLIC) . . . . .	46
2.3.7	Microscopie de phase de Hilbert stabilisée (sHPM) . . . . .	48
2.3.8	Modules de courbures de SOPC et de EPC . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Modélisations des membranes actives</b>	<b>51</b>
3.1	Equation du mouvement d'une membrane hors équilibre . . . . .	51
3.2	Modèles des canaux ioniques . . . . .	54
3.2.1	Modèle Prost-Bruinsma. [Prost et Bruinsma, 1996] . . . . .	54
3.2.2	Modèle RTP. [Ramaswamy <i>et al.</i> , 2000] . . . . .	56
3.3	Modèles avec dipôle hydrodynamique . . . . .	59
3.3.1	Modèle RTP avec dipôle hydrodynamique . . . . .	59
3.3.2	Influence de l'état interne des inclusions sur la dynamique des membranes actives . . . . .	61
3.3.3	Dipôle hydrodynamique symétrisé . . . . .	63
3.3.4	Dipôle hydrodynamique normale symétrisé. Modèle de M. Lomholt	63
3.4	Modèles à couplages implicites . . . . .	67
3.5	Dynamique de membranes actives près d'une paroi . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Mesures des propriétés physiques des membranes actives par micropipettes : Rappels</b>	<b>71</b>
4.1	Système modèle de membranes actives. . . . .	72
4.1.1	Les protéines transmembranaires utilisées . . . . .	72
4.1.2	Protocoles de reconstitution des protéines transmembranaires . . . . .	78
4.2	Principe de la technique de micropipettes . . . . .	81
4.2.1	Mesure de la tension . . . . .	82
4.2.2	Mesure de l'excès d'aire . . . . .	82
4.2.3	Mesure des modules élastiques de la membrane . . . . .	84
4.3	Résultats des mesures sur la BR . . . . .	85
4.3.1	Protocole . . . . .	85
4.3.2	Mesures de micropipettes : résultats . . . . .	86
4.3.3	Interprétation des résultats . . . . .	87
4.4	Résultats de la mesure sur l'ATPase- $Ca^{2+}$ . . . . .	88
4.4.1	Protocole. . . . .	88
4.4.2	Résultats des mesures par micromanipulation et leur interprétation	88
4.5	Conclusion . . . . .	90

<b>5</b>	<b>Spectroscopie de fluctuations de vésicules géantes passives</b>	<b>93</b>
5.1	Imagerie et détection de contours . . . . .	94
5.1.1	Détection de la position de la membrane . . . . .	94
5.1.2	Détection du contour sur une image . . . . .	97
5.1.3	Détection de contours en temps réel . . . . .	99
5.2	Des contours au spectre de fluctuations . . . . .	99
5.2.1	Analyse de Fourier. . . . .	99
5.2.2	Sélection des contours . . . . .	102
5.2.3	Précision de la détection, et artefacts . . . . .	102
5.3	Du spectre de fluctuations aux modules élastiques de la membrane . . .	104
5.3.1	Spectre de fluctuations d'une section de la vésicule . . . . .	105
5.3.2	Influence du temps d'intégration de la caméra . . . . .	105
5.3.3	Mesure des modules élastiques de membranes passives . . . . .	106
5.4	Mesure des modules élastiques de membranes passives : nos expériences	110
5.4.1	Protocole . . . . .	110
5.4.2	Résultats sur vésicules lipidiques . . . . .	110
5.4.3	Temps d'intégration et temps de pause . . . . .	115
5.4.4	Fonction de fit et taille des vésicules . . . . .	116
<b>6</b>	<b>Spectroscopie de fluctuations de vésicules géantes actives</b>	<b>121</b>
6.1	Effets attendus : Simulations . . . . .	121
6.2	Résultats antérieurs [Pécéréaux, 2004] . . . . .	124
6.2.1	Protocole de préparation des vésicules . . . . .	124
6.2.2	Résultats de Jacques Pécéréaux . . . . .	124
6.3	Nos mesures de spectres de fluctuations suivant le protocole de reconsti- tution de Jacques Pécéréaux . . . . .	126
6.3.1	Protocoles . . . . .	127
6.3.2	Mesure des spectres de fluctuations . . . . .	130
6.4	Expériences de contrôle . . . . .	134
6.4.1	Vérification de l'activité protéique . . . . .	134
6.4.2	Le potentiel transmembranaire . . . . .	135
6.4.3	Expériences de micropipettes . . . . .	137
6.4.4	Résultats : EPC et BR reconstituée dans EPC . . . . .	139
6.4.5	Méthode de reconstitution . . . . .	141
6.4.6	L'azide de sodium . . . . .	143
6.5	Quantification des effets actifs et comparaison aux modélisations théoriques	146
6.5.1	Membranes EPC contenant la BR : état passif . . . . .	146
6.5.2	Caractérisation des effets actifs . . . . .	146
6.5.3	Modélisations théoriques possibles . . . . .	148
6.5.4	Adaptation du modèle de Lomholt . . . . .	149
6.5.5	Analyse des résultats par le modèle de Lomholt . . . . .	150

<b>Conclusion.</b>	<b>159</b>
<b>A Protocoles.</b>	<b>163</b>
A.1 Protocole d'électroformation. . . . .	163
A.1.1 Préparation des lames conductrice. . . . .	163
A.1.2 Dépôt lipidique. . . . .	164
A.1.3 Hydratation et électroformation. . . . .	164
A.2 Protocole de reconstitution de la BR par détergent. . . . .	165
A.2.1 Solubilisation de la BR. . . . .	165
A.2.2 Solubilisation des lipides. . . . .	165
A.2.3 Retrait du détergent. . . . .	166
A.3 Protocole de reconstitution de la BR par l'éther. . . . .	167
A.3.1 Solubilisation des lipides. . . . .	167
A.3.2 Lyophilisation de la BR. . . . .	168
A.3.3 Mélange lipides-BR. . . . .	168
A.3.4 Dépôt sur les lames ITO. . . . .	168
A.4 Protocole de marquage de la BR avec Alexa 488. . . . .	169
A.4.1 Réaction de marquage . . . . .	169
A.4.2 rinçage de la protéine. . . . .	169
A.5 Protocole de greffage de molécule PEG sur les surfaces de verre. . . . .	170
A.5.1 activation de la surface. . . . .	170
A.5.2 Silanisation. . . . .	170
A.5.3 Greffage du PEG. . . . .	170
<b>B Molécules.</b>	<b>173</b>
B.1 Lipides. . . . .	173
B.2 Détergents. . . . .	174
B.3 Molécules fluorescentes. . . . .	175
<b>C Données additionnelles.</b>	<b>177</b>
C.1 Analyse de spectres passifs SOPC, EPC et EPC-BR. . . . .	178
C.2 Résultats Jacques Pécréaux . . . . .	182
C.3 Analyse de spectres EPC-BR actifs sans azide de sodium. . . . .	185
C.4 Analyse spectres EPC-BR actifs avec azide de sodium. . . . .	186
<b>D Expérience de reflectivité de rayons X.</b>	<b>189</b>
D.1 Principe de l'expérience. . . . .	189
D.2 Protocoles. . . . .	191
D.3 Résultats. . . . .	192
<b>Bibliographie</b>	<b>195</b>

---

## Table des figures

---

1.1	Schéma des organelles d'une cellule eucaryote . . . . .	16
1.2	Schéma des étapes du transport vésiculaire . . . . .	18
1.3	Schéma d'une membrane plasmique contenant plusieurs types de protéines	20
1.4	Structure des principaux composants des membranes cellulaires . . . . .	22
1.5	Organisation des molécules amphiphiles . . . . .	24
1.6	Diagramme de phase du phospholipide DMPC dans l'eau . . . . .	25
1.7	Evolution de l'épaisseur d'une membrane en fonction de sa composition	26
1.8	Séparation de phase pour des vésicules géantes DOPC-Cholestérol-SM	26
1.9	Mesure du coefficient de diffusion par FCS pour plusieurs compositions ternaires DOPC-Cholestérol-SM . . . . .	27
1.10	Différentes façons possible pour induire une courbure dans une membrane avec des protéines . . . . .	28
1.11	Mécanisme de propagation du potentiel d'action dans un axone . . . . .	31
2.1	Différents modes de déformations d'une membrane . . . . .	34
2.2	Courbures principales pour deux surfaces courbées . . . . .	36
2.3	Vésicules de topologies différentes de celle d'une vésicule sphérique . . . . .	37
2.4	Jauges normales et représentation de Monge . . . . .	38
2.5	Représentation d'une membrane fluctuante à toutes les échelles . . . . .	39
2.6	Schéma de l'extraction d'un tube à partir d'une vésicule aspirée dans une micropipette . . . . .	43
2.7	Evolution de la force d'extraction d'un tube membranaire en fonction de la tension . . . . .	43
2.8	Dynamométrie optique . . . . .	45
2.9	Module de courbure d'une membrane DPPC, mesuré par confocal, en fonction de la température . . . . .	46

2.10	Principe de la technique FLIC . . . . .	46
2.11	Résultats des mesures de FLIC sur des membranes supportées . . . . .	47
2.12	Schéma de la microscopie de phase de Hilbert stabilisée . . . . .	48
2.13	Spectre de fluctuations mesuré par microscopie de phase de Hilbert stabilisée . . . . .	49
3.1	Schéma d'une inclusion dans différents états conformationnels . . . . .	61
3.2	Simulation de spectres actifs issus de la théorie de Lomholt . . . . .	66
4.1	Spectre d'absorption de la BR avec un maximum à 568 nm . . . . .	73
4.2	Structure générale de la BR . . . . .	74
4.3	Cycle de pompage de la BR . . . . .	75
4.4	Changements conformationnels de la BR au cours de son cycle de pompage	76
4.5	Structures de 2 conformations de l'ATP-Ca <sup>2+</sup> . . . . .	78
4.6	Schéma du protocole de reconstitution de protéines transmembranaires à l'aide d'un détergent . . . . .	80
4.7	Test de l'activité de la BR avec la 9-aminoacridine . . . . .	81
4.8	Vésicule aspirée dans une micropipette, observée par DIC . . . . .	83
4.9	Montage de l'expérience de micropipettes . . . . .	84
4.10	Tension d'une membrane SOPC en fonction de la variation de l'excès d'aire . . . . .	85
4.11	Expérience de micropipettes sur une vésicule active contenant la BR .	87
4.12	Influence de l'incorporation l'ATPase-ca <sup>2+</sup> sur le module de courbure	89
4.13	Expériences de micropipettes sur une vésicule active contenant l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> . . . . .	90
4.14	Variation relative de la température effective en fonction de la densité de protéines (ATPase-Ca <sup>2+</sup> ) . . . . .	90
5.1	Principe de l'imagerie par contraste de phase . . . . .	95
5.2	Profil d'intensité lumineuse au niveau de la membrane . . . . .	96
5.3	Schéma de l'algorithme de détection de contours . . . . .	100
5.4	Spectre de fluctuations d'une tâche d'encre séchée sur une lame de verre	103
5.5	Correction du bruit dû à la résolution finie de la mesure . . . . .	104
5.6	Simulation de l'effet du temps d'intégration de la caméra sur le spectre de fluctuations . . . . .	107
5.7	Spectre de fluctuations d'une vésicule SOPC . . . . .	108
5.8	Modules de courbure moyennés pour trois compositions différentes . .	109
5.9	Influence des modes utilisés sur la valeur du module de courbure . . .	111
5.10	Histogramme des valeurs du module de courbure mesurées pour SOPC	112
5.11	Spectre de fluctuation d'une vésicule EPC . . . . .	113
5.12	Fit d'un spectre SOPC . . . . .	115
5.13	Fit d'un spectre EPC . . . . .	117

5.14	Variation du module de courbure mesuré avec la taille des vésicules . .	118
6.1	Simulation de spectres actifs issus de la théorie RTP . . . . .	123
6.2	Etude de la reproductibilité de la mesure des spectres de fluctuations .	131
6.3	Spectres de fluctuation actifs et passifs en absence d'azide de sodium .	133
6.4	Test d'activité de la BR avec 9-aminoacridine . . . . .	134
6.5	Evolution du courant induit par le pompage de la BR en fonction du potentiel transmembranaire . . . . .	136
6.6	Bilan des mesures du module de courbure par micropipettes pour des vésicules EPC . . . . .	139
6.7	Rapport des modules de courbure actif/passif mesuré par micropipettes	141
6.8	Image de vésicules contenant de la BR marquée avec Alexa 488 . . . .	142
6.9	Spectres de fluctuation actifs et passifs en présence d'azide de sodium	144
6.10	Test 9-aminoacridine avec et sans azide de sodium . . . . .	145
6.11	Fit de spectre acquis en présence d'azide de sodium . . . . .	147
6.12	Fit simple de spectres actifs acquis en présence d'azide de sodium . .	151
6.13	Simulations de spectres actifs issus de la théorie de Lomholt . . . . .	152
6.14	Fit des spectres actifs par l'expression de Lomholt . . . . .	153
6.15	Schémas représentant différents types de dipôles actifs . . . . .	155
C.1	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la bactériorhodopsine éclairée en rouge et ayant complètement relaxé le gradient de protons . . . . .	182
C.2	Spectres passifs, pour une vésicule SOPC-BR, avant et après illumina- tion actinique . . . . .	183
C.3	Comparaison de spectres actifs et passifs d'une même vésicule SOPC contenant la BR I . . . . .	183
C.4	Comparaison de spectres actifs et passifs d'une même vésicule SOPC contenant la BR II . . . . .	184
C.5	Comparaison de spectres actifs et passifs d'une même vésicule SOPC contenant la BR III . . . . .	184
D.1	Schéma de la mesure de réflexion des rayons X sur une structure mul- tilamellaire . . . . .	190
D.2	Mesure de l'intensité de rayons X réfléchis en fonction de $q_z$ avec diffé- rentes illuminations . . . . .	193



---

## Liste des tableaux

---

1.1	Composition de plusieurs types de membranes cellulaires . . . . .	23
1.2	Comparaison des concentrations ioniques entre l'intérieur d'une cellule animale typique et le flot sanguin . . . . .	29
2.1	Modules de courbure de membranes SOPC et EPC mesurés par différentes techniques expérimentales . . . . .	50
3.1	Termes dominants des spectres de fluctuations dans différentes limites, pour les modèles de force directe et à courbure, développés par N. Gov. [Gov, 2004] . . . . .	68
3.2	Facteur d'amplification de l'amplitude de fluctuations en présence d'une paroi à la distance $d$ de la membrane de taille $L$ . [Prost <i>et al.</i> , 1998] . . . . .	70
5.1	Modules de courbure pour EPC, SOPC, et SOPC :CHOL . . . . .	109
5.2	Etude de la loi de puissance apparente des spectres passifs . . . . .	114
6.1	Coefficient de dilatation thermique de l'eau et des membranes lipidiques	129
6.2	Résultats de Fits de spectres actifs par la théorie de Lomholt . . . . .	154
C.1	Mesure du module de courbure pour EPC . . . . .	178
C.2	Mesure de la tension pour des vésicules SOPC . . . . .	179
C.3	Mesure du module de courbure pour des vésicules SOPC . . . . .	180
C.4	Mesure du module de courbure pour des vésicules EPC-BR passives . . . . .	181
C.5	Lois de puissance apparentes pour des vésicules EPC-BR en absence d'azide de sodium . . . . .	185
C.6	Mesure de la tension et du module de courbure par procédure de fit avec temps d'intégration pour des vésicules EPC-BR . . . . .	185

C.7	Mesure de la tension et du module de courbure par fit sur des vésicules EPC-BR en présence d'azide de sodium . . . . .	186
C.8	Lois de puissance apparentes pour des vésicules EPC-BR en présence d'azide de sodium . . . . .	187
C.9	Mesure du vecteur de crossover, de la tension et du module de courbure sur des vésicules EPC-BR en présence d'azide de sodium . . . . .	188

---

## Introduction.

---

LA QUESTION DE SAVOIR ce qui différencie la matière vivante de la matière inerte a préoccupé l'intellect humain (au moins) depuis l'antiquité. Une question, aussi simple à formuler que "qu'est-ce que la vie ?", a conduit à l'émergence de tout un champ d'étude, actuellement en pleine expansion, la biologie.

Les développements, au cours du *XIX*<sup>e</sup> siècles, des techniques d'observation microscopique ont permis d'analyser la matière vivante à des échelles jusque-là inaccessibles. Un des résultats majeurs de cette avance technologique est la découverte de la structure discrète de la matière vivante, qui est constituée de briques élémentaires appelées cellules. Ces cellules représentent la plus petite structure que l'on peut qualifier de vivante (propriétés d'homéostasie, de développement, de reproduction ... etc.), et tout organisme vivant est soit unicellulaire, soit composé d'un ensemble plus ou moins complexe et varié de cellules. Mais bien qu'elle soit particulière, la matière vivante reste soumise aux lois fondamentales de la physique, et seule l'époustouflante complexité du vivant rend sa compréhension directement à partir de ces principes impraticable.

Cette complexité certes rend illusoire toute approche directe de l'ensemble des détails moléculaires, mais se baser sur une approche globale telle qu'a su mettre en place la physique statistique permettrait d'avoir une compréhension supramoléculaire des phénomènes. L'une des difficultés importantes que posent les systèmes biologiques vient du fait qu'ils sont, d'un point de vue thermodynamique, des systèmes ouverts et par définition loin de l'équilibre thermodynamique. La compréhension de ce genre de système nécessite donc le développement d'une physique nouvelle, celle des systèmes hors-équilibre.

Le travail que nous allons présenter dans ce manuscrit va dans ce sens en étant la continuation des travaux initiés par J. Prost et R. Bruinsma sur la dynamique des membranes lipidiques hors-équilibre en 1996 [Prost et Bruinsma, 1996], et poursuivis,

depuis, par plusieurs autres chercheurs dans le monde. Notre objectif était caractériser les effets de l'activité protéique sur les propriétés des membranes. Pour faire cela nous avons entrepris de mesurer le spectre de fluctuations de membranes mises hors équilibre par l'activité protéique, dans le but de confronter ces mesures aux prédictions théoriques.

Nous décrivons succinctement dans le premier chapitre la composition des membranes cellulaires et leurs rôles dans le fonctionnement de la cellule. Nous présenterons dans le chapitre 2 la modélisation théorique des membranes lipidiques à l'équilibre ainsi que différentes techniques expérimentales pour mesurer leurs propriétés élastiques. Le chapitre 3 sera consacré à un panorama des différents modèles théoriques décrivant le comportement de membranes mises hors équilibre par la présence d'inclusions actives (mimant les protéines transmembranaires). Nous présenterons en particulier les prédictions de chaque modèle pour l'effet de l'activité protéique sur les fluctuations des membranes. L'existence d'un effet de l'activité de pompes ioniques a été prouvée expérimentalement, sous la forme d'une amplification active des fluctuations membranaires [Manneville *et al.*, 1999, Girard *et al.*, 2004b]. Nous décrivons dans le chapitre 4, les systèmes biomimétiques et la technique de micropipette utilisés dans ces études antérieures, ainsi que les résultats de ces études et leur confrontation aux modélisations théoriques. A ce stade, il était apparu que pour tester encore plus en détail les modèles théoriques, il aurait fallu mesurer les spectres de fluctuations de membranes lipidiques et en particulier la dépendance entre les effets actifs et les vecteurs d'onde. Jacques Pécrcéaux, au cours de son travail de thèse, a mis en place au laboratoire un montage de reconnaissance de contours de vésicules géantes et des programmes d'analyse de ces contours qui permettent de mesurer les spectres de fluctuations. Nous présenterons ce montage expérimental dans le chapitre 5, ainsi que les résultats des mesures (ceux de Jacques Pécrcéaux et les nôtres) effectuées sur des vésicules passives. Nous présenterons dans le chapitre 6, les résultats des mesures de spectres de fluctuations, que nous avons effectuées, sur des membranes actives. Nous présenterons les différents protocoles utilisés, ainsi que les conditions nécessaires à la mesure d'effet actif. Pour finir, nous analyserons ces résultats, et les confronterons aux prédictions théoriques présentées dans le chapitre 3.

# CHAPITRE 1

---

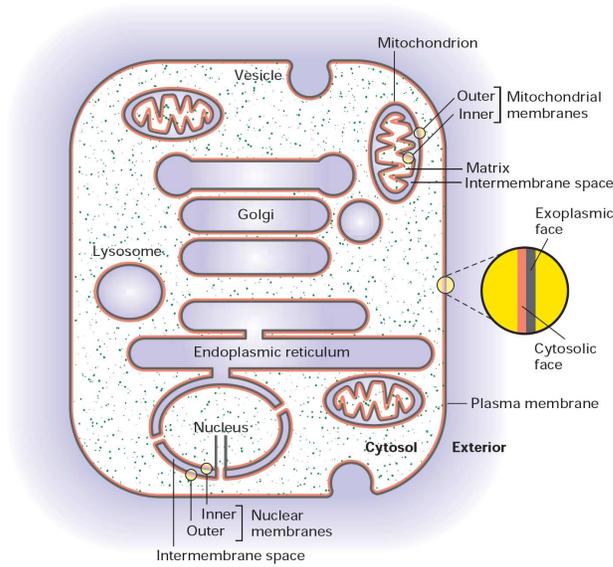
## Les membranes biologiques

---

LES ORGANISMES VIVANTS sont constitués d'une ou d'une multitude de cellules individuelles. La cellule constitue donc le plus petit organisme vivant. On peut la décrire d'une façon simpliste et grossière comme un espace délimité par une barrière sélective, dont les conditions internes sont contrôlées pour favoriser certaines réactions. La barrière est la membrane cytoplasmique et les réactions internes sont celles liées à la production de matériel et la reproduction des codes génétiques nécessaires au développement et la reproduction de l'organisme vivant. Cette image simpliste correspond à l'idée qu'on se fait des premiers organismes vivants, et est en cours d'étude de façon expérimentale [Luisi, 2006, Noireaux *et al.*, 2005].

Cette approche, presque schématique, a l'avantage de mettre en évidence le rôle fondamental des membranes dans l'organisation cellulaire. Pendant longtemps, la membrane était vue, dans le cadre du modèle fluide mosaïque [Singer et Nicolson, 1972], comme un simple support, fluide et passif, de l'activité protéique. Les résultats des études récentes mettent en évidence les limites de ce modèle en apportant des preuves du rôle de l'organisation lipidique dans les processus cellulaires. Au lieu d'un fluide bidimensionnel homogène, la membrane serait formée de domaines de propriétés différentes et plus ou moins enrichis en certains constituants (lipidiques ou protéiques). Selon cette description encore débattue, appelé communément modèle "des rafts", la membrane serait plus mosaïque que fluide [Engelman, 2005].

Nous allons consacrer ce chapitre à la présentation des membranes biologiques, en commençant par les membranes cytoplasmiques, et intracellulaires. Nous décrirons ensuite les propriétés des constituants de ces membranes, c'est à dire les lipides, et les protéines membranaires.



**Fig. 1.1.** Schéma des organelles d'une cellule eucaryote. Certaines sont délimitées par une membrane (ER, Golgi, lysosomes), et d'autres par deux membranes (noyau, mitochondrie). [Lodish et al., 2003].

## 1.1 Rôles de la membrane dans l'organisation cellulaire

Le rôle le plus évident des membranes lipidiques est d'être une barrière sélective, permettant de séparer l'intérieur de la cellule de l'extérieur par exemple. Néanmoins, la cellule doit également échanger du matériel, en particulier des ions, avec l'extérieur. Elles doivent, pour cela, contenir des éléments actifs (pompes, canaux ioniques) qui permettent de modifier les conditions chimiques à l'intérieur de la cellule ou de l'organelle. De plus différents types de molécules rentrent et sortent de la cellule par des mécanismes de transport très régulés appelés respectivement endocytose et exocytose.

Nous allons commencer cette section par la présentation de l'organisation des cellules en compartiments ainsi que les échanges entre ces compartiments. Nous nous intéresserons, ensuite, au cas particulier de la membrane plasmique et ses interactions avec le cytosquelette d'un côté, et le milieu extracellulaire de l'autre.

### 1.1.1 Compartimentalisation fonctionnelle et organelles

Les cellules eucaryotes sont entourées par une membrane plasmique qui englobe plusieurs types de compartiments appelés organelles dont chacun a un certain nombre de fonctions particulières. On voit dans la figure 1.1 un schéma très simplifié de l'organisation de ces organelles.

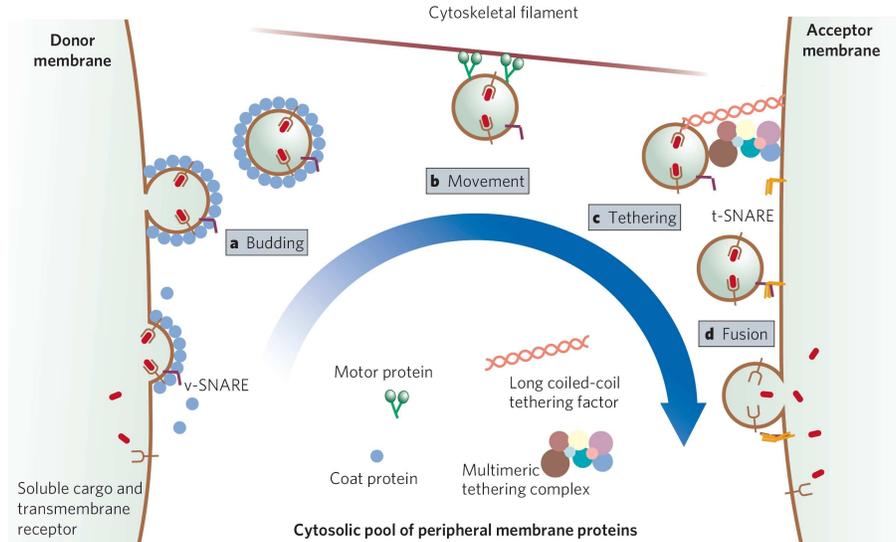
Décrivons brièvement le rôle de chaque organelle, en suivant la voie de sécrétion (de la traduction du code génétique à l'insertion de la protéine à l'endroit approprié) :

- **Noyau** : Le code génétique est contenu dans les molécules d'ADN qui sont compactées en chromosomes. Le noyau a une structure à double membrane qui contient tous les chromosomes ainsi que la machinerie de traduction du code génétique en ARN messenger. Celui-ci est transporté en dehors du noyau par les pores nucléaires (nucléoporines). Cet ARN messenger va servir de support à la synthèse des protéines.
- **Réticulum endoplasmique (ER)** : L'ER contient des feuilletts membranaires où a lieu la synthèse des lipides et protéines membranaires. La synthèse de ces dernières se fait à partir des ARN messagers par des complexes protéines-ARN appelé ribosomes qui donnent l'aspect rugueux de l'ER. Le réticulum endoplasmique contient aussi des protéines chaperonnes dont le rôle est de favoriser le repliement des protéines synthétisées dans une conformation fonctionnelle.
- **Appareil de Golgi** : L'appareil de Golgi est constitué de plusieurs compartiments (appelés cis-golgi et trans-golgi). La fonction principale de cet appareil est de trier les éléments synthétisés dans le réticulum endoplasmique et de les transférer spécifiquement vers l'organelle ou la membrane plasmique où ils doivent être incorporés. Lors de leur transport à travers les compartiments du Golgi, les protéines subissent des modifications appelées processus de maturation.
- **Endosomes** : Ce sont de petits compartiments spécialisés dans le tri des molécules internalisées par la cellule (endocytose). Ces molécules sont ensuite soit envoyées pour dégradation vers les lysosomes, soit redirigées vers d'autres organelles comme le Golgi ou l'ER.
- **Lysosomes** : Ce sont de petites organelles (200 à 500 nm) qui contiennent des conditions de pH adaptées et des enzymes spécialisées dans la dégradation des protéines. Les protéines sont dégradées dans ces organelles essentiellement pour deux raisons : (i) les protéines mal repliées lors de la synthèse. (ii) les protéines dont la concentration est régulée par un cycle de synthèse-dégradation.
- **Mitochondries** : ces organelles (plusieurs par cellule) sont formées d'une membrane externe relativement lisse et perméable aux petites molécules, et une membrane interne fortement repliée. Cette dernière est le siège de la production de l'ATP, synthétisé à partir de l'ADP et du phosphate. L'énergie nécessaire à cette réaction est produite par l'oxydation de sucres et d'acides gras à l'intérieur des mitochondries.

### 1.1.2 Transport cellulaire

Le fonctionnement correcte de la cellule nécessite de transporter différents éléments d'un compartiment à un autre. Si on prend l'exemple de la synthèse des protéines transmembranaires, elles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et doivent être transportées à l'appareil de Golgi où elles subissent des processus de maturation et de tri, avant d'être envoyées à l'endroit approprié où elles doivent être incorporées. Ces mul-

tiples étapes de transport se font essentiellement à l'aide d'intermédiaire de transport qui sont des vésicules ou des tubes membranaire [Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000].



**Fig. 1.2.** Schéma des étapes du transport vésiculaire. (a) Bourgeonnement (budding), induit par les protéines de manteau (coat proteins), d'une vésicule contenant les éléments à transporter et détachement de la membrane donneuse. (b) Désassemblage du manteau protéique, et transport de la vésicule le long de microtubules par des moteurs moléculaires. (c) Arrimage de la vésicule de transport à la membrane cible. (d) Fusion de la vésicule avec la membrane cible grâce aux protéines SNAREs. [Behnia et Munro, 2005].

La figure 1.2 décrit les étapes d'un événement de transport vésiculaire. Les éléments à transporter sont triés dans une même portion de la membrane qui est déformée par des protéines de manteau (comme la clathrine, COP I ou II) pour former la vésicule de transport. Ce bourgeon est détaché de la membrane donneuse par un événement de fission. Pour les manteaux clathrine, la fission est réalisée par la dynamine [Pishvae et Payne, 1998]. Dans les autres cas, les mécanismes et les partenaires de la fission ne sont pas encore clairement élucidés. Le manteau protéique est ensuite désassemblé, et des moteurs moléculaires (kinésines, dynéines) transportent la vésicule le long de microtubules jusqu'à la membrane cible où elle est arrimée par des complexes protéiques. La vésicule fusionne ensuite, à l'aide de protéines de la famille des SNAREs, avec la membrane cible libérant ce qu'elle contient de l'autre côté de celle-ci.

Pour plusieurs de ces étapes, les caractéristiques physiques de la membrane peuvent intervenir directement, ce qui génère différentes questions :

- Quel rôle peut jouer l'organisation latérale des lipides dans la membrane dans

l'étape de tri des éléments à transporter, et comment ce processus est influencé par la courbure de la membrane et sa tension ?

- Quelle est l'énergie nécessaire pour déformer la membrane et former la vésicule de transport, et comment l'assemblage du manteau dépend-il de la courbure de la membrane ?
- Quelles sont les contraintes à appliquer à la vésicule pour induire sa fission de la membrane mère ?
- Comment la fusion des vésicules de transport avec la membrane acceptrice dépend-elle de la tension de ces membranes ?

Ces questions sont actuellement abordées par différents équipes de biophysiciens. Par exemple, un système minimal (membrane + kinésines + microtubules + ATP) a permis d'étudier l'influence de paramètres comme la tension membranaire et la densité de moteurs sur ce processus [Leduc *et al.*, 2004, Koster *et al.*, 2003]. Des études contrôlées et quantitatives de ces processus permettraient de déterminer les rôles respectifs des différentes protéines intervenant dans ces processus et de la membrane.

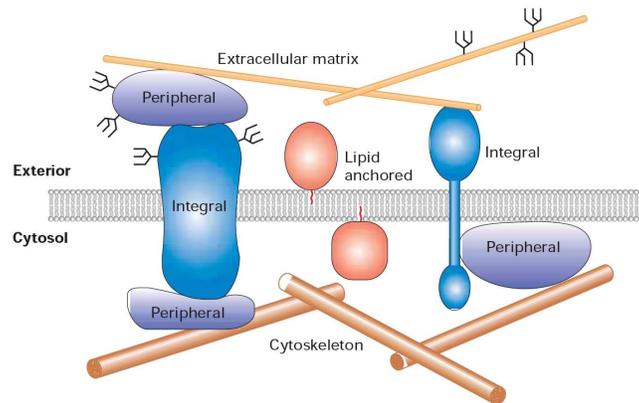
### 1.1.3 Membrane plasmique

La membrane plasmique n'est pas seulement une barrière qui sépare l'intérieur de l'extérieur de la cellule, mais c'est aussi une interface qui permet à celle-ci de sonder et d'agir sur son environnement. Elle est donc en contact avec le monde extérieur (matrice extracellulaire, autres cellules, surface de verre ... etc.), et avec le cytosol en particulier le cytosquelette (voir figure 1.3). Nous allons présenter dans la suite à travers deux exemples (Interaction avec le cytosquelette, et l'adhésion) les contraintes que peuvent subir les membranes, et le rôle que peut jouer son organisation.

#### Interactions membrane-cytosquelette

Le cytosquelette est composé de plusieurs types de filaments (biopolymères) dont les plus importants sont :

- **Les filaments d'actine** : Ils forment un gel cortical en-dessous de la membrane, qui donne à la membrane une résistance mécanique au cisaillement. Chaque filament est polaire, polymérisant à une extrémité et se dépolymérisant à l'autre. Des moteurs moléculaires (myosines) utilisent ces filaments comme support pour exercer des forces et peuvent les réticuler, ce qui donne des propriétés contractiles au gel. Différents complexes protéiques liés à la membrane (à travers CDC42 par exemple) peuvent se lier à l'actine et stimuler sa polymérisation et activer d'autres protéines (cascade de signalisation). Cette cascade de signalisation fait intervenir des protéines (le complexe Arp2/3 par exemple) qui favorisent plutôt la polymérisation de l'actine avec beaucoup de branchements (un gel) ce qui conduit à la formation d'un lamellipode [Pollard, 2003]. Dans d'autre cas la dynamique



**Fig. 1.3.** Schéma d'une membrane plasmique contenant plusieurs types de protéines (transmembranaires ou ancrées), dont certaines assure la liaison au cytosquelette, et d'autres à la matrice extracellulaire. [Lodish et al., 2003].

du cortex d'actine induit la formation de structures plus tubulaires appelées filopodes.

Les propriétés de la membrane jouent un rôle majeur dans la détermination de la structure et de la dynamique des morphologies provoquées par le comportement du cytosquelette. N. Gov et A. Gopinathan proposent un modèle dans lequel le couplage entre la protéine initiateur de la polymérisation et la courbure de la membrane influence le type de structure induite par la polymérisation de l'actine [Gov et Gopinathan, 2006]. L'actine intervient aussi dans les fibres de stress qui apparaissent lors de l'adhésion d'une cellule.

- **Les microtubules** : Ces filaments sont plus rigides que les filaments d'actine, leur longueur de persistance est de l'ordre du centimètre [Gittes *et al.*, 1993]. Ces filaments polaires s'organisent en une structure radiale à partir d'un complexe organisateur, le centrosome. Ils servent de support au déplacement de plusieurs types de moteurs moléculaires qui assurent les fonctions de transport intracellulaire (kinésines, dynéines). Ils sont aussi impliqués dans le positionnement des chromosomes dans la mitose. Un exemple où on voit clairement l'influence de la polymérisation sur l'organisation membranaire est celui de l'axone des neurones. Les microtubules s'assemblent en un faisceau qui en polymérisant induit la progression de l'axone qui peut ainsi atteindre des longueurs de l'ordre du mètre.

### Adhésion cellulaire

Les propriétés adhésives des cellules sont d'une importance capitale notamment pour les organismes multicellulaires. En effet il est nécessaire que les cellules puissent adhérer

les unes aux autres pour former des tissus, mais il leur faut aussi pouvoir se détacher pour permettre la réorganisation de ces tissus cellulaires lors de la croissance embryonnaire par exemple. Il faut donc une adhésion suffisante pour donner une cohésion au tissu mais suffisamment faible pour pouvoir être détachée lorsque c'est nécessaire, en utilisant les moyens de génération de force de la cellule ou par endocytose comme cela a été proposé.

L'adhésion cellulaire est assurée par des protéines transmembranaires exprimées au niveau de la membrane plasmique. Elles peuvent se lier du côté extracellulaire à un récepteur particulier à chaque type de protéine (Intégrine-RGD, cadhérine-cadhérine, ... etc.). Du côté cytosolique ces événements d'adhésion peuvent, dans certains cas, déclencher des cascades de signalisation qui induisent le recrutement de molécules qui recrutent, à leur tour, l'actine et forment un complexe lié au cytosquelette (points focaux d'adhésion) (voir figure 1.3).

Les molécules adhésives étant des protéines transmembranaires, leur dynamique est fortement influencée par celle de la membrane, par exemple à travers leur comportement diffusif. Cette dynamique dépend aussi fortement de l'interaction de la membrane avec le cytosquelette et en particulier de la tension membranaire [Delanoe-Ayari *et al.*, 2004].

Le message qu'il faut retenir de cette section est que les propriétés physiques de la membrane interviennent directement dans la dynamique cellulaire. La compréhension de ces mécanismes passe donc par une quantification précise des propriétés des membranes lipidiques d'un point de vue physique. C'est l'objectif de la biophysique membranaire. Nous allons présenter dans la suite les propriétés des composants majeurs de ces membranes à savoir les lipides et les protéines transmembranaires.

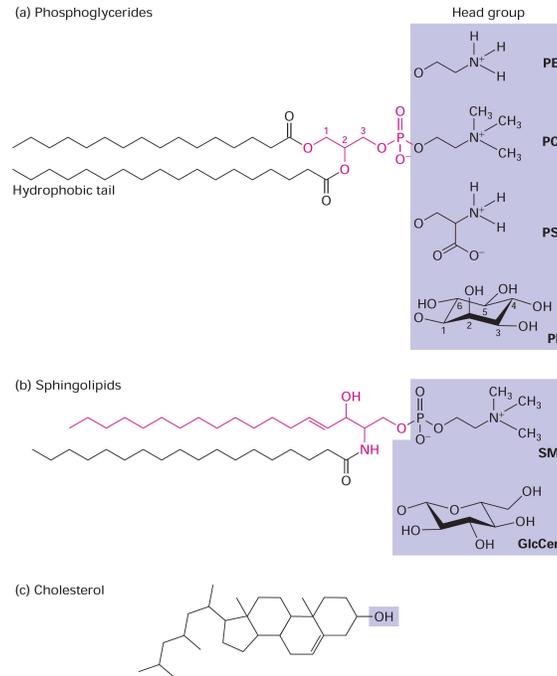
## 1.2 Physico-chimie et auto-organisation des lipides

Les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des protéines transmembranaires [Singer et Nicolson, 1972] en des proportions variables selon le type cellulaire et l'organelle étudiée (d'un rapport lipides/protéines de 1 :4 en poids pour les membranes mitochondriales à 4 :1 pour les membranes des cellules nerveuses de Schwann). Nous allons présenter dans ce chapitre les propriétés des membranes lipidiques en commençant par une description de la composition lipidique des membranes cellulaires. Nous discuterons ensuite les propriétés des membranes à un composant, puis avec un mélange de lipides mimant la composition des domaines cellulaires.

### 1.2.1 Composition lipidique des membranes cellulaires

Les membranes des cellules sont composées de bicouches contenant des lipides. Ces molécules ont des propriétés amphiphiles (tête polaire hydrophile + queue hydrophobe).

Les lipides les plus courants sont (voir figure 1.4) :



**Fig. 1.4.** Structure des principaux composants des membranes cellulaires : (a) Phosphoglycérides PE, PC, PS, et PI. (b) Sphingolipides : SM et GlcCer. (c) Cholestérol. [Lodish et al., 2003]

- **Phosphoglycérides** : Lipides composés à partir du glycérol dont les plus importants sont : phosphatidylcholine (**PC**), phosphatidylsérine (**PS**), phosphatidylethanolamine (**PE**), phosphatidylinositol (**PI**).
- **Sphingolipides** : Lipides de la famille des céramides comme la sphingomyéline (**SM**).
- **Stéroïdes** : essentiellement le cholestérol, qui ne sont pas des lipides.
- **Glycolipides** : lipides contenant des oligosaccharides, et qui jouent un rôle important dans l'interaction avec la matrice extracellulaire qui peuvent être soit des phosphoglycérides (**PI**) soit des sphingolipides comme le glucosylcéroside (**GlcCer**).

On peut voir sur le tableau éfchieur1 la composition de différents types de membranes cellulaires. La distribution de ces constituants est asymétrique entre les deux feuillets de la bicouche [Rothman, 1977, Devaux et Morris, 2004]. En particulier les PC et SM sont souvent dans le feuillet externe, et les PE et PS dans le feuillet interne des membranes cellulaires. Cette dissymétrie est introduite dès la synthèse des lipides

Membranes	PC	PE + PS	SM	Cholestérol
Globule rouge	21%	29%	21%	26%
Myéline	16%	37%	13%	34%
Plasmique (E.Coli)	0%	85%	0%	0%
Réticulum endoplasmique (rat)	54%	26%	5%	1%
Golgi (rat)	45%	20%	13%	13%
Mitochondrie interne (rat)	45%	45%	2%	7%
Mitochondrie externe (rat)	34%	46%	2%	11%

**Tab. 1.1.** *Composition de plusieurs types de membranes cellulaires (en % mol).*[Dowhan et Bogdanov, 2002]

dans le réticulum endoplasmique et est maintenue par l'activité de protéines spécialisées (les flipases) dont le rôle est de transporter des molécules d'un feuillet à l'autre de la membrane [Lodish *et al.*, 2003, Sprong *et al.*, 2001].

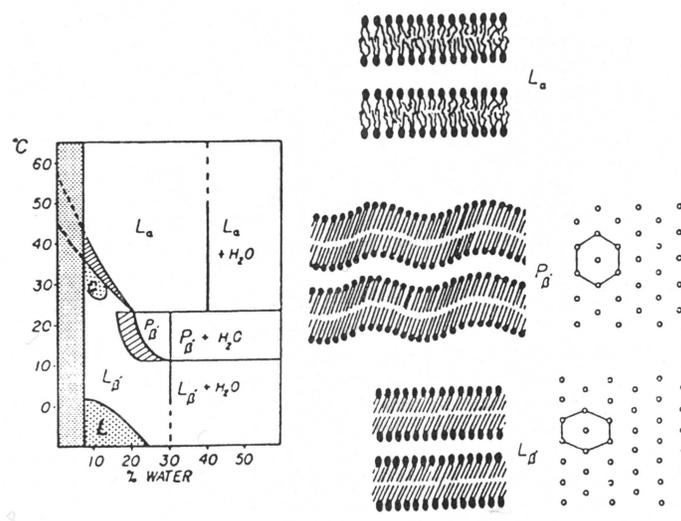
L'organisation latérale des lipides dans la membrane n'est pas homogène non plus. La solubilisation par détergent des membranes cellulaires a montré l'existence de domaines résistants à cette solubilisation, qui sont constitués essentiellement de Sphingomyéline et de cholestérol [Brown et Rose, 1992, Lingwood et Simons, 2007]. C'est l'élément fondateur du modèle des rafts [Simon et Ikonen, 1997]. Le caractère intrusif de cette méthode a suscité de nombreuses polémiques sur l'interprétation de ces résultats [Jacobson *et al.*, 2007, Lingwood et Simons, 2007]. Il semble actuellement admis que la taille des domaines dans les membranes cellulaires varie entre 20 nm et une centaine de nanomètres [Jacobson *et al.*, 2007]. L'implication de ces domaines dans le transport cellulaire reste encore débattue dans la communauté.

### 1.2.2 Membranes lipidiques homogènes

Avant de pouvoir étudier le comportement des membranes cellulaires, complexes de part leur composition, il est judicieux d'étudier le comportement de structures constituées d'un seul type de molécule amphiphile. Ce genre d'étude est réalisé dans le cadre de la physique de la matière molle et plus particulièrement des cristaux liquides lyotropes [De-Gennes et Prost, 1993].

Les molécules amphiphiles solubilisées dans une solution aqueuse tendent à s'auto-assembler dans des structures qui leurs permettent de minimiser le contact entre l'eau et leurs chaînes hydrophobes. Le type de structure dépend de la quantité de molécules amphiphiles présentes dans la solution, de la forme géométrique de ces molécules (rapport entre partie hydrophile et partie hydrophobe), et de la température [Israelachvili, 1992]. Si la molécule est plutôt en forme de cône, elle aura tendance à former des micelles (cas des détergents). Si les parties hydrophile et hydrophobe ont des tailles équivalentes de





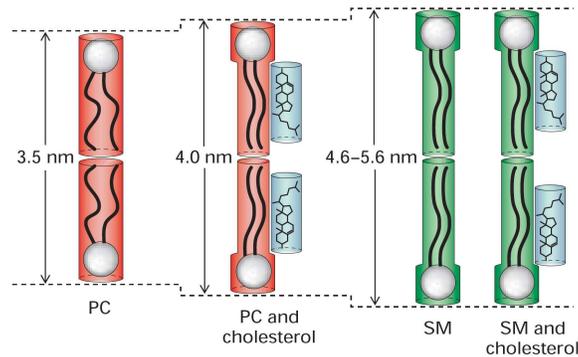
**Fig. 1.6.** Diagramme de phase du phospholipide DMPC dans l'eau, avec des représentations de l'organisation des membranes pour les phases  $L_\alpha$ ,  $P_\beta$ , et  $L_\beta$ . D'après [Seifert, 1997]

### 1.2.3 Mélange lipidique mimant la composition des "Rafts"

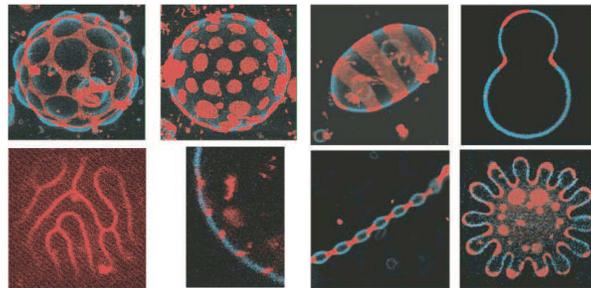
Nous avons vu dans les parties précédentes que les composants principaux des membranes cellulaires sont des phosphoglycérides, la sphingomyéline, et le cholestérol. Il est donc naturel que des compositions mimant ces membranes natives soient étudiées à l'aide de systèmes artificiels (vésicules géantes par exemple). D'autre part, les expériences de solubilisation de membranes cellulaires par détergent (Triton X 100) ont montré l'existence de domaines résistants au détergent [DRM = Detergent Resistant Membrane] dont la composition est un tiers de Phosphoglycérides, un tiers de sphingolipides, et un tiers de stérols [Edidin, 2003]. Ceci explique l'intérêt des physiciens pour les membranes constituées de mélanges ternaires du type DOPC-SM-Cholestérol.

La présence de cholestérol dans les membranes constituées de phospholipides (PC) induit une augmentation de son épaisseur. Ainsi, il a été mesuré que pour une membrane de PC (C16 :0 ou C18 :1) que celle-ci passe de 3,5 nm à 4,0 nm en présence de cholestérol. L'épaisseur, plus grande, des membranes sphingomyéline (de 4,6 nm pour C18 :0 à 5,6 nm pour C24 :0) ne change pas avec l'addition de cholestérol [Sprong *et al.*, 2001]. De plus, des études sur vésicules géantes de mélanges ternaires DOPC-SM-cholestérol, ont montré qu'on pouvait obtenir une séparation de phases pour certaines compositions, entre une phase liquide ordonné  $L_o$  riche en SM et une seconde phase liquide désordonné  $L_d$  riche en DOPC. Ainsi, [Baumgart *et al.*, 2003] ont visualisé cette coexistence de phase grâce à la microscopie à deux photons (figure 1.8).

Les phases  $L_o$  et  $L_d$  sont toutes les deux fluides, mais se différencient par la mobilité



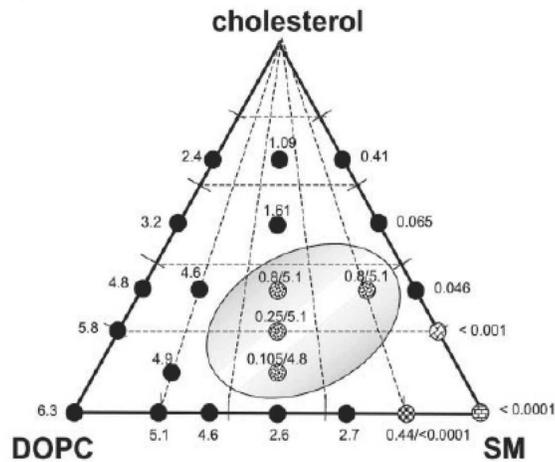
**Fig. 1.7.** Différence d'épaisseur entre une membrane PC (C16 :0 / C18 :1) pure (3,5 nm), PC (C16 :0 / C18 :1) + Cholestérol (4 nm), Sphingomyéline et Sphingomyéline + Cholestérol (4,6 pour C18 :0 à 5,6 nm pour C24 :0). Adapté par [Lodish et al., 2003] de [Sprong et al., 2001].



**Fig. 1.8.** Visualisation de la séparation de phase pour de vésicules géantes de composition ternaire DOPC-Cholestérol-SM. La phase liquide ordonné est marquée en bleu, la phase liquide désordonné est marquée en rouge. [Baumgart et al., 2003].

des lipides qui les composent. Ceci se traduit par un coefficient de diffusion plus grand dans la phase  $L_d$  par rapport à celui de la phase  $L_o$ . [Kahya *et al.*, 2003] l'ont montré en mesurant, par la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), les coefficients de diffusion pour différentes compositions. Les résultats de ces mesures sont résumés dans la figure 1.9. La forme des domaines dans les vésicules montrant une coexistence de phases est aussi affectée par la nature du stérol utilisé (en particulier la courbure notamment près des frontières entre phases) [Bacia *et al.*, 2005].

Une séparation de phase similaire a été observée dans des cellules épithéliales [Meder *et al.*, 2006]. La ségrégation de protéines membranaires entre ces différents domaines a été étudiée à la fois dans des systèmes modèles de type vésicule géante et sur des fragments cellulaires (blebs) [Boumgart *et al.*, 2007]. Grâce aux développements des



**Fig. 1.9.** Mesure du coefficient de diffusion par FCS pour plusieurs compositions ternaires DOPC-Cholestérol-SM. Les points noirs correspondent à des compositions homogènes fluides, les points en briques à des phases gel pures, et les autres à des coexistences de phases. Les nombre au-dessus de chaque point correspondent au coefficient de diffusion en  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . [Kahya et al., 2003]

techniques de formation des vésicules géantes, il est maintenant possible d'en fabriquer à partir de membrane cellulaire, en gardant l'orientation initiale des protéines, et dans des conditions physiologiques [Ruth-Montes *et al.*, 2007]. Ceci permettrait d'étudier des systèmes plus complexes que le mélange ternaire tout en faisant abstraction des interactions avec le cytosquelette, ou des phénomènes de transport qui interviennent dans la régulation de la taille des domaines.

### 1.3 Les protéines membranaires

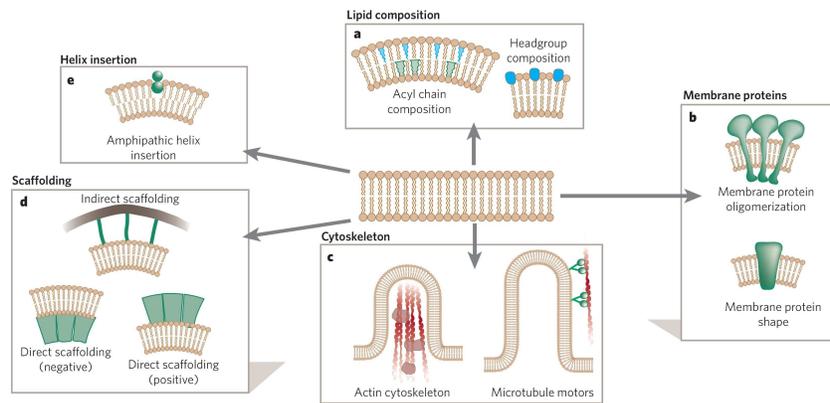
Différents types de protéines interagissent avec les membranes ou y sont contenues. Citons, par exemple :

- Les protéines ancrées à la membrane en s'associant avec un lipide comme le glycosylphosphatidylinositol (GPI).
- Protéines à hélice amphipatique comme les GTP-ases de la famille Rho. Ces protéines sont complètement hydrophiles quand elles sont liées au GDP. Mais si elles s'associent au GTP, elles ont un changement de conformation qui fait sortir une hélice hydrophobe qui leur permet de s'ancrer à la membrane. De nombreuses autres protéines à ancre amphipatique ou possédant des motifs BAR ou MIME, reliés à la courbure de la membrane [McMahon et Gallop, 2005], peuvent s'asso-

cier transitoirement à la membrane durant des épisodes de transport.

- Protéines transmembranaires qui sont insérées dans la membrane dès leur synthèse dans l'ER.

Les interactions entre ces différents types de protéines et la membrane peuvent modifier les propriétés de cette dernière. Elles peuvent, par exemple, induire la courbure de la membrane par plusieurs mécanismes, résumés dans la figure 1.10, qui sont activement étudiés par plusieurs groupes de recherche.



**Fig. 1.10.** Différentes façons possible pour induire une courbure dans une membrane avec des protéines : (a) composition asymétrique entre les deux feuilletts. (b) la présence de protéines (seules ou oligomérisées) de forme coniques. (c) Action du cytosquelette (traction par moteurs ou polymérisation). (d) Action d'un manteau protéique qui induit la déformation de la membrane. (e) Insertion d'une hélice amphipatique d'un côté de la membrane. [McMahon et Gallop, 2005].

Nous allons nous intéresser dans la suite aux protéines transmembranaires. Ce type de protéines remplit plusieurs fonctions, comme la transduction de signaux d'un côté à l'autre de la membrane sous forme de cascades de signalisation ou la polymérisation du cytosquelette (exemple des protéines d'adhésion). D'autres protéines transmembranaires (pompes et canaux) sont spécialisées dans le transport d'ions, et de petites molécules organiques. Ce sont ces dernières que je vais décrire plus en détail dans la suite.

### 1.3.1 Les pompes et les transporteurs transmembranaires

Il est nécessaire pour le fonctionnement de la cellule de contrôler la concentration de certains éléments, comme le calcium, le sodium, le potassium, ou le pH, et de maintenir donc des concentrations d'ions dans le milieu cellulaire différente de celles de l'extérieur (tableau 1.2). Pour cela, la cellule utilise des canaux et des pompes qui régulent de façon active ces concentrations, en consommant de l'énergie. Ces pompes passent par

Ions	Cellule (mM)	Sang (mM)
$K^+$	139	4
$Na^+$	12	145
$Cl^-$	4	116
$HCO_3^-$	12	29
$Mg^{2+}$	0,8	1,5
$Ca^{2+}$	<0,0002	1,8

**Tab. 1.2.** Comparaison des concentrations ioniques entre l'intérieur d'une cellule animale typique et le flot sanguin. D'après [Lodish et al., 2003].

des changements de conformations cycliques qui conduisent au transport de quelques molécules par cycle. Chaque cycle durant quelques millisecondes, le rythme de transport de ces pompes est de l'ordre de  $10^3$  ions/s.

Ces protéines transmembranaires utilisent une source d'énergie (généralement l'hydrolyse de l'ATP, ou la lumière pour les organelles photosynthétiques) pour transporter de manière sélective des ions. Nous décrirons dans le chapitre 4 deux protéines de ce type (la bactériorhodopsine une pompe à protons, et l'ATP-ase  $Ca^{2+}$  une pompe à calcium).

Tous les transporteurs n'utilisent pas l'ATP ou la lumière pour leur activité. Certains cotransporteurs couplent l'énergie gagnée par le transport d'un élément dans le sens de son gradient au transport d'un deuxième élément dans le sens opposé à son gradient.

Certaines pompes sont capable de transporter plusieurs types de molécules (ions, métaux lourds, peptides, stéroïdes, drogues anticancéreuses ... etc.) d'un coté à l'autre de la membrane comme les transporteurs ABC [Dean *et al.*, 2001]. Ces protéines sont aussi appelées des MDR (MultiDrug Resistant proteins) car elles sont responsables de la résistance de cellules cancéreuses aux chimiothérapies (ces transporteurs pompent les molécules du traitement en dehors des cellules cancéreuses, empêchant ainsi leur intoxication). La compréhension du fonctionnement de ces transporteurs a une importance d'ordre thérapeutique, qui peut guider les stratégies de traitements anticancéreux.

Il existe aussi des protéines qui fonctionnent à la fois comme des pompes et des moteurs moléculaires. C'est le cas de l'ATP-ase F1/F0 (présente dans les membranes mitochondriales) qui peut utiliser un gradient de proton préexistant pour former de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate, ou faire l'inverse, hydrolyser l'ATP pour créer un gradient de proton. Dans le même temps cette protéine est animée d'un mouvement de rotation très impressionnant (50 à 100 tours/s).

### 1.3.2 Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui permettent à la cellule de contrôler la perméabilité de la membrane de façon sélective. En effet ces canaux ne laissent généralement passer qu'un seul type d'ions. A la différence des pompes où chaque cycle de changement de conformation correspond au transport d'un nombre limité d'ions, une fois ouverts les canaux peuvent laisser passer, en présence d'un gradient, un grand nombre d'ions ( $\sim 10^6$  ions/s). Après une période d'ouverture, les canaux passent de manière stochastique à une conformation bloquée (pas de conduction, ni de possibilité d'ouverture) avant de revenir à l'état fermé (pas de conduction, mais possibilité d'ouverture).

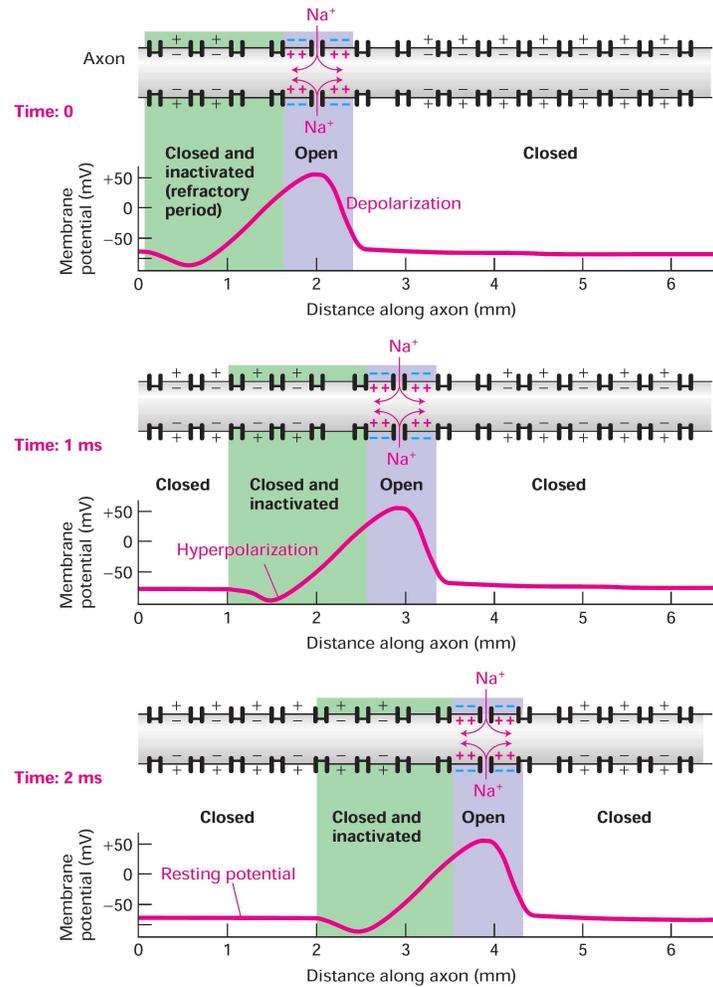
L'ouverture des différents types de canaux se fait en réponse à différents types de stimuli :

- Dépolarisation du potentiel transmembranaire. Ce sont les "voltage-gated channels".
- Augmentation de la tension membranaire. Ce sont les canaux mécano-sensibles.
- Fixation d'une molécule spécifique par le canal.

Les derniers canaux ont une importance primordiale au niveau des synapses neuronales. La transmission du potentiel d'action (onde de dépolarisation du potentiel membranaire) d'un neurone à l'autre se fait au niveau de la synapse par la sécrétion d'un neurotransmetteur qui induit l'ouverture des canaux ioniques du neurone récepteur, qui y induit la propagation d'un nouveau potentiel d'action.

Un exemple du rôle que peuvent avoir les canaux voltage-gated est, précisément, la propagation du potentiel d'action dans les axones. Grâce à l'activité de pompes à sodium et à potassium le potentiel transmembranaire est maintenu à une valeur d'équilibre de l'ordre de  $-70$  mV, avec un excès de potassium et un déficit de sodium à l'intérieur de l'axone. Comme on peut le voir sur la figure 1.11, une première dépolarisation de la membrane induit l'ouverture des canaux sodium. L'influx d'ions sodium dans l'axone propage la dépolarisation dans un sens. Le blocage des canaux ouverts l'empêche la propagation de cette dépolarisation dans le sens opposé. Bien que cette première explication donne le mécanisme général, il n'est pas possible de décrire correctement le potentiel d'action sans introduire les canaux à potassium (aussi voltage-gated), qui ont une dynamique d'ouverture plus lente que les canaux sodium, et permettent la repolarisation rapide de la membrane [Hodgkin et Huxley, 1952, Alberts *et al.*, 1989, Lodish *et al.*, 2003].

Nous avons succinctement présenté dans ce chapitre l'organisation et la composition des membranes cellulaires. La complexité phénoménale de ces membranes rend délicate l'interprétation des résultats obtenus dans l'étude de ces membranes *in vivo*. Cette complexité explique l'avantage que procurent les systèmes modèles en donnant la possibilité de comprendre des mécanismes fondamentaux sur des systèmes simples. Le



**Fig. 1.11.** Mécanisme de propagation du potentiel d'action dans un axone : La dépolarisation initiale de la membrane induit l'ouverture des canaux limitrophes. L'influx de sodium propage la dépolarisation dans un sens, et le blocage des canaux ouverts l'empêche dans l'autre sens. [Lodish et al., 2003].

travail de thèse que nous allons présenter dans ce manuscrit, va dans cette direction, et poursuit l'étude des membranes hors-équilibre par un système biomimétique simple : les vésicules géantes.



## CHAPITRE 2

---

### Les membranes lipidiques à l'équilibre

---

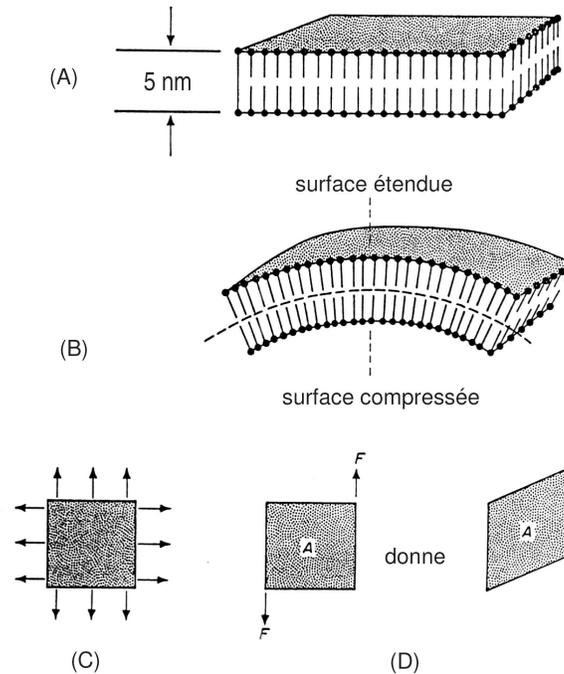
COMME NOUS L'AVONS PRÉSENTÉ dans le chapitre précédent, les membranes jouent des rôles importants (barrière, encapsulation, transport ... etc.) dans plusieurs fonctions biologiques. Pour avoir une compréhension complète de ces fonctions, il faut d'abord être en mesure de décrire le comportement de ces membranes par des modèles physiques qui permettent de réduire leurs propriétés en un nombre fini de paramètres. En mesurant ensuite les valeurs de ces paramètres pour des systèmes réels on peut arriver à une description quantitative des propriétés d'une membrane biologique. Ainsi, on peut estimer l'énergie à fournir (et sous quelle forme) pour accomplir une fonction particulière, comme par exemple former une vésicule de transport. Cette compréhension quantitative permettrait de ne retenir, parmi toutes les possibilités permises par la complexité des systèmes biologiques, que les mécanismes qui sont cohérents avec les propriétés membranaires et les caractéristiques des différents acteurs qui peuvent y prendre part (moteurs moléculaires, complexes protéiques, cytosquelette, ... etc.).

Nous allons décrire dans ce chapitre le modèle théorique initié par Canham [Canham, 1970], Helfrich [Helfrich, 1973a], et Evans [Evans, 1973] ainsi que les développements qui en sont issus qui permettent de décrire le comportement des membranes (lipidiques en particulier) à l'équilibre (propriétés mécaniques, fluctuations, formes d'équilibres ... etc.). Nous présenterons ensuite des techniques expérimentales qui permettent de mesurer les paramètres physiques décrivant la membrane, en particulier le module de courbure  $\kappa$ .

## 2.1 Modélisation théorique des membranes lipidiques à l'équilibre

### 2.1.1 Propriétés mécaniques des membranes

La déformation d'une membrane peut être décomposée en une combinaison linéaire de trois types de déformations élémentaires qui sont de symétries différentes : (i) Extension / compression qui est isotrope, (ii) cisaillement qui se fait à surface constante, (iii) courbure perpendiculaire au plan de la membrane. Nous allons présenter dans la suite les caractéristiques de ces trois déformations élémentaires.



**Fig. 2.1.** Différents modes de déformations d'une membrane : (A) schéma d'une membrane plane, (B) Courbure, (C) extension / compression, (D) cisaillement. (D'après [Canham, 1970])

#### Extension / compression :

Cette déformation correspond à une variation de l'aire de la membrane (plus précisément l'aire par lipide dans une description moléculaire). L'augmentation de l'aire

correspond à l'extension, sa diminution à la compression. La densité surfacique d'énergie d'une telle déformation pour membrane d'une aire  $A$  variant de  $\Delta A$  s'écrit :

$$f_{ext} = \frac{1}{2}\chi \left( \frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (2.1)$$

où  $\chi$  est le module de compression qui est de l'ordre de  $0,2 J/m^2$  pour des membranes lipidiques [Evans et Rawicz, 1990, Olbrich *et al.*, 2000]. La variation relative ne peut dépasser 8%, pour une tension limite appelée "tension de lyse". Au delà de cette valeur, on a l'ouverture de pores dans la membrane qui conduisent à sa destruction [Sandre *et al.*, 1999, Rawicz *et al.*, 2000].

### Cisaillement :

La densité d'énergie associée au cisaillement de la membrane est obtenue par la loi de Hooke et s'écrit :

$$f_{cis} = \frac{1}{2}\mu(\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (2.2)$$

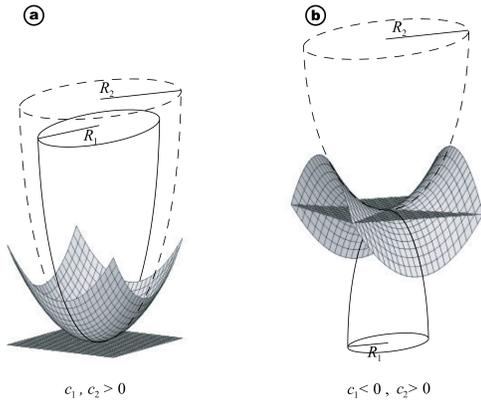
où  $\lambda = (L_0 + \Delta L)/L_0$  est le taux d'extension latérale et  $\mu$  le module de cisaillement (en  $J/m^2$ ). La valeur de ce module dépend de l'état d'organisation de la membrane. Il n'est à prendre en compte que pour des membranes en phase cristal liquide ou polymérisées. Il est nul pour les membranes en phase fluide car ce type de membrane n'oppose aucune force au cisaillement. Cependant, la présence d'un cytosquelette peut conférer une résistance au cisaillement à des membranes fluides. C'est le cas du globule rouge avec la présence du réseau de spectrine sous la membrane plasmique. Le module de cisaillement du globule rouge a été mesuré par des expériences de micropipettes  $\mu = 6.10^{-6} J/m^2$  [Mohandas et Evans, 1994], et par pince optique  $\mu = 2,5 \pm 0,4.10^{-6} J/m^2$  [Henon *et al.*, 1999].

### Courbure :

La courbure d'une membrane peut être décrite par deux courbures principales ( $c_1 = \frac{1}{R_1}$ ,  $c_2 = \frac{1}{R_2}$ ) qui dépendent du référentiel utilisé pour paramétriser la membrane (figure 2.2). On peut s'affranchir de cette dépendance en considérant la courbure moyenne  $H = c_1 + c_2$  et la courbure gaussienne  $K = c_1.c_2$  qui sont invariants. D'un point de vu géométrique, ces deux grandeurs sont respectivement la trace et le déterminant du tenseur de courbure, et sont donc invariants quelle que soit la paramétrisation choisie.

Il est donc naturel d'exprimer la densité d'énergie associée à la courbure comme une combinaison de ces deux grandeurs [Canham, 1970, Helfrich, 1973a]

$$f_{courb} = \frac{1}{2}\kappa(H - H_0)^2 + \kappa_G K \quad (2.3)$$



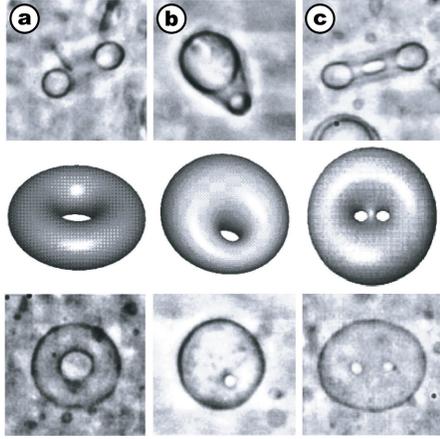
**Fig. 2.2.** Courbures principales pour deux surfaces courbées : (a) courbures de même signe, forme ellipsoïdale. (b) Courbures de signes opposés, forme dite en "selle de cheval". [Girard, 2004]

La membrane est caractérisée par trois paramètres phénoménologiques :

- **Module de rigidité de courbure  $\kappa$**  : La valeur de ce paramètre dépend du détail moléculaire de la membrane (longueur et flexibilité des queues lipidiques, interactions entre têtes polaires, ... etc.) [Rawicz *et al.*, 2000]. Elle varie avec la composition de la membrane et des conditions du milieu extérieur (pH, force ionique, ... etc.). Ce paramètre est de l'ordre de  $10^{-19} J$  pour des membranes lipidiques. Nous exposerons dans la suite de ce chapitre des méthodes expérimentales qui permettent de le mesurer.
- **Module élastique gaussien  $\kappa_G$**  : caractérise l'énergie élastique associée à la courbure intrinsèque (ou gaussienne). Il n'intervient que pour des déformations qui changent la topologie de la membrane (homogène). Ce module a pu être mesuré ( $\kappa_G \sim 10^{-19} J$ ) en analysant la forme de vésicules montrant une coexistence de phases (section 1.2.3) [Baumgart *et al.*, 2005].
- **Courbure spontanée  $H_0$**  : Ce paramètre caractérise la courbure d'équilibre de la membrane en l'absence de contrainte. Une courbure spontanée non nulle est possible dans le cas d'une dissymétrie entre les deux feuilletts de la bicouche (aire, composition, ... etc.)

Le théorème de Gauss-Bonnet [do Carmo, 1976] assure que l'intégrale de la courbure gaussienne sur l'aire d'une vésicule  $\int K dA = 4\pi(1 - g)$  est un invariant topologique. Ce terme ne dépend que du genre topologique ( $g$ ) de la surface considérée :  $g=0$  pour les topologies équivalente à une vésicule sphérique (sans trou),  $g=1$  pour des vésicules en tore (donc avec un trou), ... etc. (figure 2.3).

Ce terme demeure donc constant tant qu'on ne change pas la topologie de la surface étudiée. C'est le cas de la majorité des études faites sur des vésicules. On va donc omettre ce terme dans la suite de notre exposé.



**Fig. 2.3.** *Vésicules de topologies différentes de celle d'une vésicule sphérique : (a) vésicule torique de section circulaire ( $g=1$ ). (b) cyclide de Dupin dont le trou est excentré ( $g=1$ ). (c) "Vésicule bouton" ( $g=2$ ). [Michalet, 1994]*

## La tension membranaire

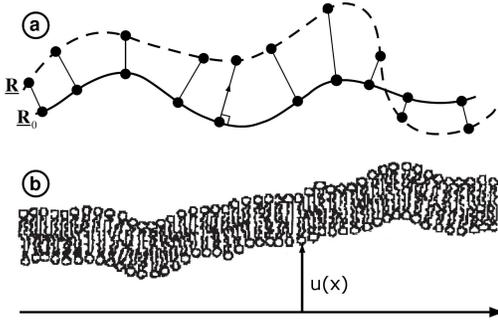
Pour décrire la membrane par un modèle théorique il faut définir l'hamiltonien  $\mathcal{H}$  relatif à ce système. C'est ce que nous allons faire dans la section suivante. Mais avant de faire cela, introduisons d'abord le concept de tension membranaire. On peut définir la tension superficielle dans une membrane d'aire  $A$  par  $\sigma = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial A}$ . On obtient que  $\sigma = K_a \Delta A / A$  qui représente la contribution enthalpique à la tension. Nous verrons dans la suite de ce chapitre que la membrane est sujette à des fluctuations thermiques qui introduisent une contribution entropique à la tension. Ce point sera explicité après la présentation de ces fluctuations. A part pour des membranes qui sont sous des contraintes latérales élevées qui suppriment les fluctuations, la contribution enthalpique à la tension est généralement négligeable. On peut considérer la membrane comme une surface d'aire fixe. Dans ce régime on peut introduire un multiplicateur de Lagrange associé à la contrainte d'aire constante. C'est ainsi qu'on définit la tension membranaire dans ces conditions.

### 2.1.2 Hamiltonien de Helfrich

Pour étudier les propriétés de la membrane, il faut écrire un hamiltonien avec les formes d'énergies pertinentes pour ce système. La courbure constitue la contribution dominante pour une membrane fluide et libre. Canham et Helfrich [Canham, 1970, Helfrich, 1973a] ont proposé un hamiltonien sur la base de la densité d'énergie de courbure, appelé **Hamiltonien de Canham-Helfrich**, qui constitue l'élément clé du modèle dit de courbure et qui s'écrit :

$$\mathcal{H} = \int dA \frac{1}{2} [\kappa(H - H_0)^2 + \kappa_G K] \quad (2.4)$$

Pour modéliser une membrane d'une aire constante englobant un volume de solution



**Fig. 2.4.** (a) Définition des jauges normales, avec  $\mathbf{R}_0$  surface de référence et  $\mathbf{n}_0$  champ de vecteurs normaux. La surface en pointillés représente la position de la membrane à un autre moment. (b) Représentation de Monge avec  $u(\mathbf{x})$  distance entre la membrane et le plan référence.

constant (comme c'est le cas d'une vésicule), il faut introduire en plus une densité surfacique d'énergie constante  $\sigma$  correspondant à la tension membranaire et qui traduit la contrainte d'aire constante. Ce hamiltonien est appelé **Hamiltonien de Helfrich** et s'écrit :

$$\mathcal{H} = \int dA \left[ \frac{\kappa}{2} (H - H_0)^2 + \sigma \right] \quad (2.5)$$

Les différentes modélisations des membranes se basent sur ce hamiltonien en incluant des termes additionnels pertinents pour chaque cas particulier.

### Représentation de Monge

Pour décrire les variations de la position de membrane, on choisit une surface  $\mathbf{R}_0$  qui sert de référence. La position de la membrane est repérée par rapport à cette référence à l'aide d'un champ  $\mathbf{n}_0$  de vecteurs normaux à la surface  $\mathbf{R}_0$  :  $\mathbf{R}(u) = \mathbf{R}_0(u) + h(u) \cdot \mathbf{n}_0(u)$ .  $h(u)$  est la distance entre la surface référence et la membrane selon la normale  $\mathbf{n}_0(u)$  (figure 2.4(a)). Cette paramétrisation est appelée jauge normale.

Le choix particulier d'une surface de référence plane est appelée jauge de Monge (figure 2.4 (b)). On repère dans ce cas la position de la membrane par la hauteur  $u(\mathbf{x})$ ,  $\mathbf{x}$  correspondant à la base cartésienne du plan référence. Dans l'approximation quadratique  $|\nabla u|^2 \ll 1$ , le hamiltonien de Helfrich se simplifie et devient :

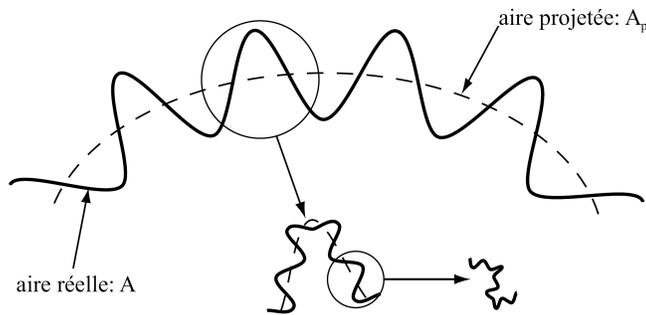
$$\mathcal{H}_H = \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{x} [\kappa(\nabla^2 u)^2 + \sigma(\nabla u)^2] \quad (2.6)$$

## 2.2 Fluctuations des membranes et leurs implications

En 1827, Robert Brown a rapporté ses observations sur le mouvement erratique qui anime des grains microscopiques (pollen) suspendus dans l'eau, appelé depuis mouvement brownien. Ce mouvement erratique est dû aux chocs thermiques incessants des molécules du solvant (l'eau par exemple) avec la particule en suspension, comme l'ont

prouvé les travaux théoriques d'A. Einstein et de M. Smoluchowski, et l'étude expérimentale de J. Périn au début du  $XX^e$  siècle. Ces travaux ont une importance historique du fait qu'ils ont prouvé la nature moléculaire de la matière.

Une membrane lipidique, bien qu'elle puisse avoir une extension spatiale supérieure à plusieurs dizaines de microns reste un objet d'épaisseur nanométrique (typiquement 5 nm). Elle est donc animée d'un mouvement erratique (Brownien) selon la direction perpendiculaire, et ce à toutes les échelles (figure 2.5). C'est ce qu'on appelle les fluctuations thermiques des membranes. Ce phénomène a été observé il y a plus d'un siècle par le biologiste E. Browicz sur les globules rouges. En effet il a remarqué que les cellules diffusaient la lumière de manière erratique ce qui donne un effet de scintillement (flickering). F. Brochard et J.F. Lennon ont montré en 1975 que ce scintillement est en fait dû aux fluctuations thermiques de la membrane du globule rouge [Brochard et Lennon, 1975].



**Fig. 2.5.** Représentation d'une membrane fluctuante à toutes les échelles. Les courbes en pointillés représentent l'aire projetée observée avec une résolution qui ne permet pas de distinguer la membrane fluctuante réelle. [Girard, 2004]

Pour caractériser les fluctuations des membranes, nous allons dériver l'expression de l'amplitude de ces fluctuations en fonction du vecteur d'onde. C'est ce qu'on appelle le spectre de ces fluctuations. On considère une membrane d'une aire microscopique  $A$  fixée à un cadre d'une aire  $A_p = L \times L$ . Du fait des fluctuations l'aire réelle de la membrane  $A$  est plus grande que l'aire  $A_p$  appelée aire projetée. Dans ce régime fluctuant, l'aire  $A$  reste fixe car elle est définie par le nombre de lipides dans la membrane qu'on considère incompressible. L'aire projetée peut varier dépendant du cadre auquel on fixe la membrane (du volume de solution qu'elle entoure pour une vésicule), mais elle sera toujours plus petite que l'aire  $A$ . La différence  $\Delta A = A - A_p$  est appelée excès d'aire stockée dans les fluctuations de la membrane.

### 2.2.1 Spectre de fluctuations

Pour dériver l'expression du spectre de fluctuations d'une membrane de module de courbure  $\kappa$  et de tension  $\sigma$ , nous allons réécrire la hamiltonien de Helfrich en passant par une transformée de Fourier définie par :

$$f(\mathbf{q}, t) = \int d^2\mathbf{x} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{x}} f(\mathbf{x}, t) \quad (2.7)$$

Le Hamiltonien de Helfrich devient :

$$\mathcal{H}_H[u] = \frac{1}{2} \int \frac{d^2\mathbf{q}}{(2\pi)^2} (\kappa q^4 + \sigma q^2) |u(\mathbf{q}, t)|^2 \quad (2.8)$$

Nous avons donc une énergie moyenne par mode de fluctuation  $\mathbf{q}$  qui s'écrit :

$$E_{\mathbf{q}} = \frac{1}{2} (\kappa q^4 + \sigma q^2) \langle |u(\mathbf{q}, t)|^2 \rangle \quad (2.9)$$

A l'équilibre thermodynamique le théorème d'équipartition nous assure que chaque mode de fluctuation contient en moyenne une quantité d'énergie fixe  $E_{\mathbf{q}} = \frac{k_B T}{2}$ . On en déduit que :

$$\langle |u(\mathbf{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \quad (2.10)$$

Ceci est l'expression du spectre de fluctuations d'une membrane libre. On peut calculer l'amplitude des fluctuations de la membrane fixée au cadre  $L \times L$ , en intégrant le spectre de fluctuations sur les vecteurs d'onde entre  $\frac{2\pi}{L}$ , et  $+\infty$  (plus précisément un cut-off moléculaire  $a_0$  qu'on fait tendre vers 0). On trouve :

$$\langle |u(L)|^2 \rangle = \int_{\frac{2\pi}{L}}^{+\infty} \frac{d^2\mathbf{q}}{(2\pi)^2} \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} = \frac{k_B T}{4\pi\sigma} \ln \left( 1 + \frac{\sigma}{\kappa} \frac{L^2}{(2\pi)^2} \right) \quad (2.11)$$

En étudiant cette expression on trouve qu'on a deux régimes délimités par un vecteur d'onde  $q_c = \sqrt{\frac{\sigma}{\kappa}}$  (crossover). L'expression de l'amplitude des fluctuations  $\bar{u} = \sqrt{\langle |u(L)|^2 \rangle}$  se simplifie dans les deux limites :

- pour  $q_c \gg \frac{2\pi}{L}$  on a  $\bar{u} = \sqrt{\frac{k_B T}{16\pi^3\kappa}} \times L$ . C'est le régime dominé par la courbure.
- pour  $q_c \ll \frac{2\pi}{L}$  on a  $\bar{u} = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi\sigma} (\ln(\frac{2\pi}{L}) - \ln(q_c))}$ . C'est le régime dominé par la tension.

### 2.2.2 Excès d'aire et tension entropique

Nous avons vu dans la première section de ce chapitre que la tension de la membrane était composée de deux contributions. Une tension enthalpique qui correspond à la

variation de l'aire par lipide, et une tension entropique qui est liée aux fluctuations de la membrane.

Pour expliquer ces deux régimes prenons l'exemple d'un polymère sans interaction de volume exclu (cas le plus simple). Une fois plongé dans un solvant ce polymère va former une pelote pour maximiser son entropie. Pour étirer ce polymère, il faut payer un coût énergétique correspondant à la réduction de son entropie (moins de conformations accessibles). On a une raideur entropique. On n'atteint le régime enthalpique que quand on a presque totalement étiré le polymère.

Helfrich a dérivé une expression de la tension dans le régime entropique  $\sigma_S$  [Helfrich, 1985] :

$$\sigma_S \simeq \frac{\kappa}{a_0} \exp\left(-\frac{8\pi\kappa}{k_B T} \frac{A - A_p}{A}\right) \quad (2.12)$$

$a_0$  étant un cut-off moléculaire. On constate que plus la différence entre l'aire réelle et l'aire projetée est grande, plus la tension est faible. Ceci correspond à l'intuition selon laquelle plus on tend la membrane, plus on réduit les fluctuations.

Il est intéressant de relier la variation de l'excès d'aire stockée dans les fluctuations à la variation de la tension en partant d'un état référence d'excès d'aire  $\alpha_0$  et de tension  $\sigma_0$  en prenant en compte à la fois les contributions enthalpique et entropique. On trouve dans ce cas [Evans et Rawicz, 1990] :

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{1 + cA\sigma}{1 + cA\sigma_0}\right) + \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (2.13)$$

avec  $c = \frac{1}{24\pi}$  et A l'aire de la vésicule. Une expression similaire a été dérivée par [Fournier *et al.*, 2001] en prenant en compte l'effet de résolution finie de la méthode d'observation par une méthode de "coarse-graining".

## 2.3 Méthodes de mesure des propriétés physiques des membranes

La modélisation théorique des membranes (avec le hamiltonien de Helfrich par exemple) permet de réduire la description de ses propriétés à un nombre de paramètres fini, typiquement le module de courbure  $\kappa$  et la tension  $\sigma$  pour une vésicule. Lors du travail expérimental que nous avons mené, et que nous rapportons dans ce manuscrit, nous avons utilisé les techniques de reconnaissance et analyse de contours ainsi que les micropipettes. Ces deux techniques seront présentées indépendamment (chapitre 4 pour les micropipettes, et chapitre 5 pour la reconnaissance de contours), et ne seront citées ici que brièvement. Nous allons présenter dans cette section quelques techniques de caractérisation qui peuvent être appliquées à l'étude des membranes actives.

### 2.3.1 Aspiration par micropipettes

Le principe de la méthode d'aspiration par micropipette, mise au point dans le groupe de E. Evans [Kwok et Evans, 1981, Evans et Needham, 1987], se base sur la mise en relation de la variation de l'excès d'aire  $\Delta\alpha$  déplié par l'aspiration et de la tension membranaire  $\sigma$  que cette même aspiration impose. Ces deux grandeurs sont reliées théoriquement par la relation :

$$\Delta\alpha \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right) + \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (2.14)$$

En utilisant cette expression pour fitter les mesures expérimentales on a accès aux valeurs de  $\kappa$  ( $\frac{k_B T}{8\pi\kappa}$  pour être précis) et  $K_a$  [Evans et Rawicz, 1990].

### 2.3.2 Extraction de tubes membranaires

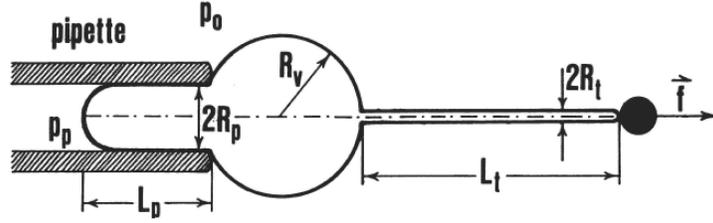
Une autre manière de caractériser les propriétés de la membrane (en particulier son module de courbure  $\kappa$ ) consiste en la mesure de la force nécessaire pour l'extrusion et l'extension d'un tube membranaire.

Les premières extractions de tubes ont été effectuées sur des globules rouges, en les attachant à une surface de verre, et en les plaçant dans un flux hydrodynamique [Hochmuth *et al.*, 1973], puis en les aspirants dans une micropipette pour contrôler leur tension [Hochmuth *et al.*, 1982]. Des expériences similaires ont été conduites sur des vésicules lipidiques avec des méthodes similaires : extraction par flux hydrodynamique [Waugh, 1982], par gravité [Bo et Waugh, 1989], en aspirant la vésicule dans une pipette pour en fixer la tension et appliquer une force locale grâce à une bille tenue par une pince optique par exemple [Cuvelier *et al.*, 2005]. La modélisation théorique de ce système a été entreprise d'abord par [Svetina *et al.*, 1998], puis par [Derényi *et al.*, 2002, Powers *et al.*, 2002].

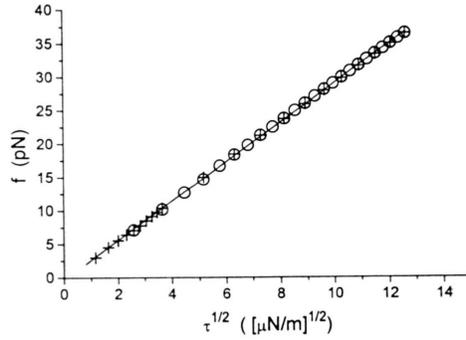
La géométrie de cette dernière méthode est présentée dans la figure 2.6. La micropipette permet d'imposer et de varier la tension de la membrane. On peut également mesurer la force d'extraction  $\vec{f}$  avec une pince optique. La modélisation théorique de ce système par [Derényi *et al.*, 2002] permet de relier ces deux grandeurs. En effet ils trouvent qu'une fois le tube formé, la force nécessaire à son extension est constante et s'écrit :

$$|\vec{f}_0| = 2\pi\sqrt{2\kappa} \times \sqrt{\sigma} \quad (2.15)$$

Cette force évolue linéairement avec la racine carrée de la tension membranaire (mise en évidence expérimentale figure 2.7). La mesure de la pente de cette évolution linéaire permet de remonter directement au module de courbure de la membrane  $\kappa$ . La différence avec l'expérience d'aspiration par micropipette est qu'on mesure le rapport  $\frac{k_B T}{\kappa}$  avec



**Fig. 2.6.** Schéma de l'extraction d'un tube à partir d'une vésicule aspirée dans une micropipette. La force  $\vec{f}$  appliquée à une bille attachée à la membrane permet l'extraction du tube. Cette force peut être appliquée par une deuxième pipette (ne permet pas de mesurer la force appliquée), une microfibre, une pince optique, ou une pince magnétique. En reliant la tension imposée par l'aspiration à la force nécessaire à l'extraction du tube, on peut mesurer le module de courbure de la membrane  $\kappa$ . D'après [Svetina et al., 1998]



**Fig. 2.7.** Mise en évidence expérimentale de la variation linéaire de la force d'extension du tube en fonction de la racine carrée de la tension (notée  $\tau$  sur la figure). Ces expériences correspondent à des membranes SOPC et permettent de mesurer le module de courbure de cette composition  $\kappa = 1,17 \cdot 10^{-19}$  J. [Heinrich et Waugh, 1996].

celle-ci tandis que l'extraction de tubes nous donne un accès direct à la valeur de  $\kappa$ . Cette différence pourrait être importante dans le cas des membranes hors-équilibre.

### 2.3.3 Reconnaissance et analyse de contours

Les techniques de reconnaissance de contours se basent sur l'analyse des fluctuations des membranes à l'échelle optique. Pour mettre en œuvre cette méthode il faut observer une vésicule par microscopie optique (contraste de phase ou DIC). On réalise la mise au

point généralement au niveau équatorial de la vésicule. La reconnaissance consiste en la détermination de la position de la membrane de proche en proche pour détecter une partie ou l'ensemble du contour. En faisant cela sur une série d'images statistiquement représentatives des fluctuations de la membrane, on applique une transformée de Fourier pour mesurer l'amplitude des différents modes de fluctuation. En comparant ces mesures à une expression théorique adaptée aux conditions expérimentales de ces amplitudes, on peut mesurer la tension  $\sigma$  et le module de courbure  $\kappa$  de la membrane. Cette méthode sera décrite plus en détail dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

### 2.3.4 Microrhéologie sur membrane

Une manière de sonder les propriétés de la membrane est d'y attacher une bille et d'étudier son mouvement. Cette méthode est particulièrement adaptée aux membranes en phase gel, qui sont difficile à caractériser par micropipettes, extraction de tube, ou détection de fluctuations.

Une caractéristique de la membrane qu'on peut mesurer de cette manière est sa viscosité surfacique  $\eta_S$ . Cette viscosité est relié à la friction subie par une bille, fixée à la membrane, de rayon  $a$  et due à la présence de la membrane par la relation [Dimova *et al.*, 2006] :

$$\zeta_m \simeq 2,93\eta_S \left( \frac{\eta a}{\eta_S} \right)^{0,1} \quad (2.16)$$

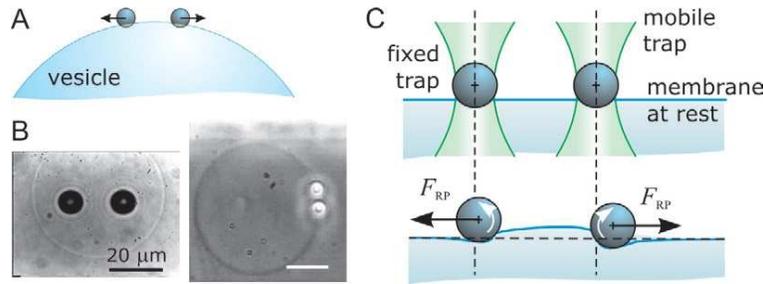
$\eta$  étant la viscosité du fluide environnant. Cette friction membranaire contribue avec la friction de stokes  $\zeta_0 = 6\pi\eta a$  à la friction totale qui s'écrit donc :

$$\zeta = \zeta_0 + \zeta_m \quad (2.17)$$

Pour mesurer cette friction on peut :

- étudier la mouvement brownien d'une petite bille attachée à la membrane ( $a < 2 \mu m$ ), mesurer son coefficient de diffusion, et utiliser la relation d'Einstein-Stokes pour remonter à la friction.
- Fixer une "grosse" bille à la membrane (suffisamment grosse pour avoir une gravité significative) en haut de la vésicule à l'aide d'une pince optique par exemple. Une fois relâchée de la pince la bille va sédimenter. En étudiant sa trajectoire on peut remonter au coefficient de friction.
- Approcher un piège optique à proximité d'une bille fixée à la membrane et étudier la dynamique du piégeage de cette bille.

La viscosité surfacique d'une membrane de DMPC a été ainsi mesurée en fonction de la température [Dimova *et al.*, 2001]. Les auteurs de cette étude ont trouvé des viscosités surfaciques de l'ordre de  $\eta_S \sim 10^{-5} sp$  dans la phase fluide. Cette viscosité diverge en loi de puissance près de la température de transition de phase fluide-gel  $T_m = 23,4^\circ C$ .



**Fig. 2.8.** Schémas (A,C), et images (B) de la technique de mesure du module de courbure de la membrane par dynamométrie optique. [Dimova et Pouligny, 2007]

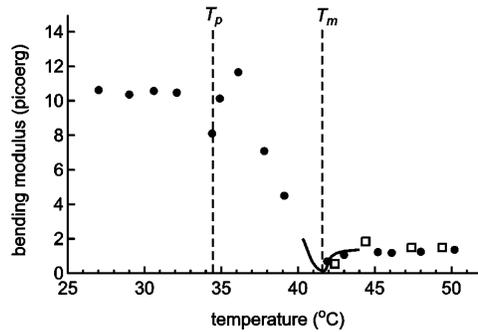
En utilisant deux billes fixées à la membrane, l'une piégée par une pince optique fixe, l'autre par un piège optique mobile, on peut mesurer le module de courbure de la membrane en déformant la membrane à l'aide du piège mobile (figure 2.8). Cette technique, appelée dynamométrie optique, permet de mesurer  $\kappa$  pour des membranes en phase gel.

### 2.3.5 Mesure par microscopie confocale

Pour étudier l'évolution du module de courbure d'une membrane au long de la transition de la phase fluide à la phase gel il faut une méthode de mesure fiable dans ces deux régimes. La mesure du module de courbure par microscopie confocale à l'avantage d'être une mesure complètement optique qui ne nécessite pas des fluctuations optiquement résolues (difficiles à obtenir pour les membranes en phase gel).

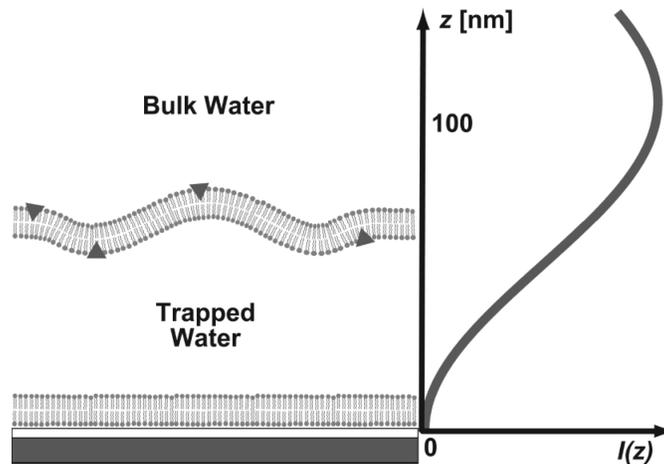
Le principe de cette mesure consiste à déformer la vésicule grâce à la pression de radiation d'un laser puissant ( $\lambda = 532\text{ nm}$ , 40 mW au niveau de l'échantillon). Un deuxième laser de faible puissance ( $\lambda = 633\text{ nm}$ , 80  $\mu\text{W}$  au niveau de l'échantillon) permet de mesurer le déplacement de la membrane avec une résolution de l'ordre du nanomètre grâce la technique confocale différentielle [Lee et Wang, 1997]. Le laser de mesure est fortement focalisé de telle sorte qu'un petit mouvement de la membrane en dehors du plan focal change significativement l'intensité qu'elle réfléchit. La pression de radiation utilisée induit des déformations de la membrane d'une amplitude de l'ordre de quelques centaines de nanomètre.

La pression de radiation étant constante, l'amplitude dépend directement du module de courbure. Plus ce module est faible, plus est grande la déformation. [Lee *et al.*, 2001] ont utilisé cette propriété pour mesurer le module de courbure de vésicule de DPPC à différentes températures entre  $27^\circ\text{C}$  (phase gel) à  $50^\circ\text{C}$  (phase fluide). Les résultats de ces mesures sont résumés dans le graphe de la figure 2.9. On remarque que la valeur du module de courbure diminue de façon significative entre les températures  $T_p$  (température de prétransition) et  $T_m$  (température de transition).



**Fig. 2.9.** *Module de courbure mesuré par confocal pour une membrane DPPC en fonction de la température (ronds noirs). Les carrés clairs correspondent aux mesure de [Fernandez-Puente et al., 1994], et la courbe continue aux prédictions de [Heimburg, 1998]. D'après [Lee et al., 2001]*

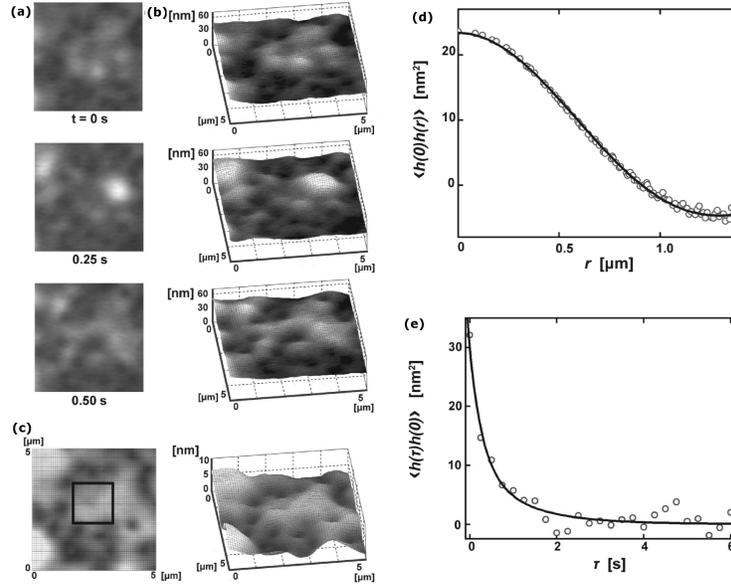
### 2.3.6 Microscopie par interférence de fluorescence (FLIC)



**Fig. 2.10.** *A gauche : schéma d'une membrane fluctuante supportée (sur une première membrane). A droite : profil d'intensité de l'onde stationnaire d'excitation. [Kaizuka et Groves, 2006]*

L'étude du comportement d'une membrane près d'une paroi a une importance à la fois d'un point de vue biologique (jonctions cellulaires) et physique (dynamique des membranes en milieu confiné). Plusieurs méthode de détection permettent d'avoir une

très haute résolution près de la surface comme le RICM [Rädler et Sackmann, 1993], TIRF [Tamm et Kalb, 1993], ou le FRET intermembranaire [Wong et Groves, 2002]. Nous allons présenter dans cette section une technique nommée FLIC qui a été utilisée récemment pour caractériser la dynamique d'une membrane lipidique dans un milieu confiné [Kaizuka et Groves, 2006].



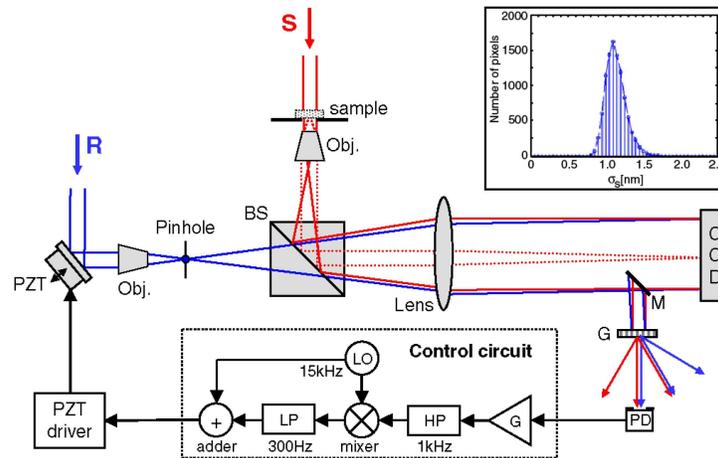
**Fig. 2.11.** (a) Images d'une membrane supportée fluctuante. (b) Reconstruction 3D du profil de la membrane pour chaque image. (c) Distribution spatiale de l'amplitude des fluctuations. Les régions sombres correspondent à des zones d'adhésion de la membrane. (d) et (e) représentent respectivement les mesures des fonctions de corrélation spatiale et temporelle de la hauteur de la membrane. Les lignes continues sont les prédictions du modèle de [Gov et al., 2003]. D'après [Kaizuka et Groves, 2006]

La microscopie par interférence de fluorescence (FLIC) est une technique d'imagerie, développée par le groupe de P. Fromherz [Lambacher et Fromherz, 1996], qui permet d'atteindre une résolution nanométrique dans la direction perpendiculaire à la surface  $\mathbf{z}$  sur une distance de l'ordre de la centaine de nanomètres. Si une membrane fluorescente se trouve à proximité ( $d \sim 100 \text{ nm}$ ) d'une surface réfléchissante (un wafer de silicium par exemple), l'intensité d'excitation incidente et réfléchi interfèrent. On excite donc la fluorescence par une onde stationnaire dont le profil est donné dans la figure 2.10 (partie droite). L'intensité de fluorescence mesurée est fortement corrélée à la distance entre la membrane et la surface réfléchissante, ce qui permet de déterminer la position de la membrane avec une précision nanométrique.

[Kaizuka et Groves, 2006] ont observé le profil d'une membrane fluorescente suppor-

tée à l'aide de cette technique (schéma coté gauche de la figure 2.10). La figure 2.11 résume les résultats de ces mesures. On voit en (a) une série d'images d'une membrane supportée et leur reconstruction 3D après déconvolution en (b). L'amplitude des fluctuations pour chaque point de la membrane (moyennée sur 100 images) est représentée dans (c). (d) et (e) correspondent respectivement aux fonctions de corrélation spatiale et temporelle de ce type de membrane. Ces mesures ont permis de confirmer les modélisations théoriques décrivant la dynamique des membranes en milieu confiné [Seifert, 1993, Prost *et al.*, 1998] et en particulier [Gov *et al.*, 2003].

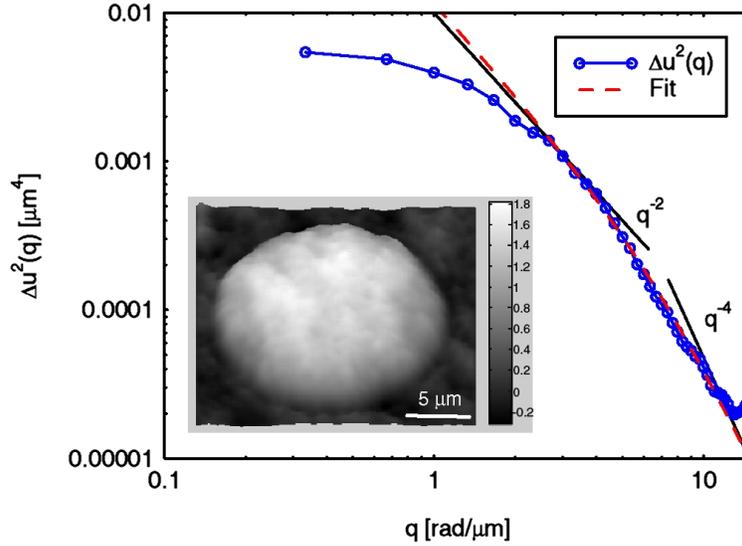
### 2.3.7 Microscopie de phase de Hilbert stabilisée (sHPM)



**Fig. 2.12.** Schéma de la microscopie de phase de Hilbert stabilisée. Le faisceau rouge correspond à l'illumination de l'échantillon, tandis que le bleu représente le faisceau référence. D'après [Popescu *et al.*, 2006].

La microscopie de phase de Hilbert stabilisée (Schéma du montage figure 2.12) est une méthode interférentielle qui donne une résolution de l'ordre de 1,2 nm dans la direction transversale. Le principe de cette technique consiste à séparer le laser d'illumination en deux : un rayon référence (en bleu sur la figure 2.12), et un rayon qui interagit avec l'échantillon (en rouge sur la figure 2.12). Ces deux rayons interfèrent au niveau de la caméra CCD. Avant cela le rayon référence est tourné de manière à avoir des frange d'interférence uniforme faisant un angle de  $45^\circ$  avec le repère (x,y). Les variations de phase induites par l'objet observé sont extraites du signal mesuré par une transformation de Hilbert. Le bruit de phase inhérent à cette mesure est supprimé par une boucle de rétroaction. C'est pour cela qu'on parle de microscopie de phase de Hilbert stabilisée. L'acquisition de l'image se faisant en une seule prise, elle permet aussi d'avoir une

bonne fréquence temporelle d'acquisition (291 images/s). Ces caractéristiques rendent cette technique particulièrement adaptée à la détection des fluctuations de membrane.



**Fig. 2.13.** Spectre de fluctuations (ronds + ligne bleue) d'une vésicule SOPC mesuré par microscopie de phase de Hilbert stabilisée (sHPM), dont une image est donnée en exemple. La courbe rouge en traits correspond au fit par l'expression théorique  $\frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2}$ . [Popescu et al., 2006]

[Popescu *et al.*, 2006] ont utilisé cette méthode pour mesurer la tension de globules rouges de différentes formes (discocyte, échinocyte, et sphérocyte) en mesurant leurs spectres de fluctuations. Mais avant de faire cela, ils ont validé leur méthode en mesurant le spectre de fluctuations de vésicules SOPC. On voit sur la figure 2.13 la reconstitution en trois dimensions de l'image d'une partie de la vésicule, et le spectre de fluctuations mesuré grâce à cette méthode. En fittant ce spectre avec l'expression théorique  $\frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2}$ , les auteurs ont mesuré pour cette vésicule une tension  $\sigma = (3,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = (0,7 \pm 0,12) \cdot 10^{-20} \text{ J}$ .

En mesurant les spectres de fluctuations de globules rouges dans différentes formes, les auteurs ont montré que la tension augmente quand on passe de la forme discocyte  $\sigma = (1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$  à la forme sphérocyte  $\sigma = (8,25 \pm 1,6) \cdot 10^{-6} \text{ J/m}$ .

Cette méthode permet de mesurer des spectres de fluctuations de façon non-intrusive. Et comme on utilise une fenêtre d'observation de taille fixe, cette méthode permet de mesurer les amplitudes de fluctuations pour des valeurs identiques de vecteurs d'onde ce qui permet de comparer les spectres acquis sur des vésicules ou cellules différentes.

### 2.3.8 Modules de courbures de SOPC et de EPC

Nous avons présenté dans les sections précédentes différentes techniques de mesure des propriétés mécaniques des membranes lipidiques. Nous donnons dans le tableau 2.1 les résultats de la mesure du module de courbure  $\kappa$  de membranes SOPC par différentes techniques expérimentales. La valeur retenue dans la littérature pour ce module de courbure est de l'ordre de  $30 k_B T = 12 \cdot 10^{-20} J$ , mais on remarque des écarts importants par rapport à cette valeur selon la technique utilisée, voir pour une même technique. La situation est similaire pour le module de courbure d'EPC dont la valeur admise dans la littérature est de  $4 \cdot 10^{-20} J = 10 k_B T$ . Malgré les développements techniques récents, la détermination du module de courbure des membranes lipidiques reste une mesure délicate.

Lipides	Techniques	$\kappa$ (J)	
SOPC	Extraction de tube :	$20 \cdot 10^{-20} J$	[Bo et Waugh, 1989]
	Micropipettes :	$9 \cdot 10^{-20} J$	[Evans et Rawicz, 1990]
		$4, 6 \cdot 10^{-20} J$	[Girard, 2004]
	Détection de contours :	$18, 1 \cdot 10^{-20} J$	[Gerbeaud, 1998]
		$12, 7 \cdot 10^{-20} J$	[Döbereiner <i>et al.</i> , 2003]
		$12, 6 \cdot 10^{-20} J$	[Pécéréaux <i>et al.</i> , 2004]
sHPM :	$0, 7 \cdot 10^{-20} J$	[Popescu <i>et al.</i> , 2006]	
EPC	fonction de corrélation :	$10 - 20 \cdot 10^{-20} J$	[Schneider <i>et al.</i> , 1984]
	Détection de contours :	$4 - 5 \cdot 10^{-20} J$	[Faucon <i>et al.</i> , 1989]
		$11, 5 \cdot 10^{-20} J$	[Duwe <i>et al.</i> , 1990]
		$8 \cdot 10^{-20} J$	[Mutz et Helfrich, 1990]
		$6, 6 \cdot 10^{-20} J$	[Méléard <i>et al.</i> , 1998]
		$4, 25 \cdot 10^{-20} J$	[Pécéréaux <i>et al.</i> , 2004]
Micropipettes :	$4, 8 \cdot 10^{-20} J$	[Girard, 2004]	

**Tab. 2.1.** Modules de courbure de membranes SOPC et EPC mesurés par différentes techniques expérimentales.

Nous avons vu dans ce chapitre la modélisation théorique permettant de caractériser les propriétés des membranes à l'équilibre. Nous avons aussi donné des exemples de techniques expérimentales qui permettent de mesurer les paramètres physiques issus de cette modélisation. Nous allons nous intéresser dans la suite au cas des membranes hors-équilibre en présentant des modèles théoriques qui ont été développés pour leur étude.

---

## Modélisations des membranes actives

---

LES MEMBRANES CELLULAIRES sont des barrières sélectives contenant des éléments actifs, dont l'activité consomme de l'énergie. Ces systèmes sont donc hors équilibre et nécessitent le développement d'approches physiques nouvelles pour prendre en compte cette activité et déterminer son influence sur les propriétés de la membrane. Nous allons présenter dans ce chapitre une approche théorique générale utilisée, par [Prost et Bruinsma, 1996], pour étudier la dynamique des membranes (actives ou passives). Cette approche a été utilisée dans différents modèles de membranes actives qui diffèrent par les hypothèses faites sur la nature des forces actives et les couplages entre les centres actifs et la membrane, qu'ils considèrent [Ramaswamy *et al.*, 2000] [Manneville *et al.*, 2001, Gov, 2004, Chen, 2004, Lacoste et Lau, 2005, Lomholt, 2006b]. Ces différents modèles prévoient des modifications différentes du spectre de fluctuations des membranes actives. Ils sont chacun adaptés à un type de centre actif, selon qu'ils sont dominés par les effets de perméation, les effets hydrodynamiques, ou les couplages entre les protéines et la membrane.

### 3.1 Equation du mouvement d'une membrane hors équilibre

Le spectre de fluctuation d'une membrane à l'équilibre peut être déterminé, après la spécification de l'hamiltonien  $\mathcal{H}$  décrivant le système, en utilisant le théorème d'équipartition. Cependant, ce théorème n'est pas valide pour les systèmes hors-équilibre. Il faut donc dériver les équations du mouvement de la membrane, qui est immergée dans un solvant (l'eau en général), et qui peut donc subir deux types de forces :

- Forces de perméation, décrites par l'équation de Darcy
- Forces hydrodynamiques, prises en compte par l'équation de Stokes

### Equation de Darcy

Une équation décrivant la dynamique d'une membrane doit relier le mouvement de cette membrane aux forces s'exerçant sur elle. L'équation de Darcy permet cela en reliant le flux de solvant traversant la membrane par perméation à ces forces. Si on définit  $u$  la position de la membrane et  $\mathbf{z}$  la direction normale, ce flux est la différence entre la vitesse de la membrane selon cette normale  $\frac{\partial u(\mathbf{r}_\perp, t)}{\partial t}$  et la vitesse du solvant dans cette même direction  $v_z(\mathbf{r}_\perp, z = 0, t)$ .

$$\begin{aligned} \frac{\partial u(\mathbf{r}_\perp, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_\perp, z = 0, t) = \lambda_p \{ \delta P(\mathbf{r}_\perp, t) - \delta \Pi(\mathbf{r}_\perp, t) \\ + f_p(\mathbf{r}_\perp, t) + f_a(\mathbf{r}_\perp, t) \} \end{aligned} \quad (3.1)$$

où  $\lambda_p$  est le coefficient de perméation de la membrane. Les forces appliquées à la membrane sont :

- $\delta P(\mathbf{r}_\perp, t)$  différence de pression de part et d'autre de la membrane.
- $\delta \Pi(\mathbf{r}_\perp, t)$  différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane.
- $f_p(\mathbf{r}_\perp, t)$  force thermique stochastique vérifiant le théorème fluctuation-dissipation :

$$\langle f_p(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle = 0 \quad (3.2)$$

$$\langle f_p(\mathbf{r}_\perp, t) \cdot f_p(\mathbf{r}'_\perp, t') \rangle = 2k_B T \lambda_p^{-1} \delta(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp) \delta(t - t') \quad (3.3)$$

- $f_a(\mathbf{r}_\perp, t)$  forces exercées par les inclusions actives sur la membrane, dont les caractéristiques dépendent des propriétés des centres actifs.

Pour décrire le système de façon complète il reste à prendre en compte la dynamique du solvant et des inclusions.

### Equations de Stokes et d'incompressibilité

Le comportement dynamique de la membrane est fortement couplé à l'hydrodynamique du solvant notamment au voisinage de la membrane. Tout mouvement de la membrane induit des déplacements de fluide, qui exercent des forces sur d'autres parties de la membrane. A l'équilibre, le théorème d'équipartition de l'énergie prend ces effets en compte de manière implicite, car tous les degrés de liberté contiennent une énergie  $\frac{k_B T}{2}$ .

Les membranes considérées sont de taille microscopique, immergées dans un solvant constitué essentiellement d'eau. La modélisation du solvant est simplifiée du fait qu'on est dans un régime à faible nombre de Reynolds. Sachant ce que valent : la densité volumique  $\rho_s = 10^3 \text{ kg/m}^3$ , la viscosité de l'eau  $\eta = 10^{-3} \text{ kg/m.s}$ , la vitesse typique

du solvant  $V_s \propto 10 \mu m/s$ , et la taille typique de la membrane  $L \propto 10 \mu m$ , le calcul du nombre de Reynolds donne  $\mathcal{R}_e = \rho_s V_s L / \eta \simeq 10^{-4} \ll 1$ . On est donc dans un régime dominé par la viscosité du fluide, où on peut négliger les effets inertiels. L'hydrodynamique obéit, dans ces conditions à l'équation de Stokes :

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \vec{\nabla} P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_\perp, t)} \delta(z) \mathbf{z} + \mathbf{f}_{ad}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \quad (3.4)$$

Le membre de droite de l'équation de Stokes correspond aux forces exercées sur le fluide :

- $\vec{\nabla} P(\mathbf{r}, t)$  : le gradient de pression dans le solvant.
- $\frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_\perp, t)} \delta(z) \mathbf{z}$  : les contraintes élastiques appliquées par la membrane sur le solvant.
- $\mathbf{f}_{ad}(\mathbf{r}, t)$  : les forces dues à l'activité des centres actifs et qui dépend de leurs propriétés.
- $\mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t)$  : forces d'origine thermique qui vérifient le théorème fluctuation-dissipation :

$$\langle \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \rangle = \mathbf{0} \quad (3.5)$$

$$\langle \mathbf{f}_{hi}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{f}_{hj}(\mathbf{r}', t') \rangle = 2k_B T \eta \{ -\delta_{ij} \nabla^2 + \partial_i \partial_j \} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t') \quad (3.6)$$

De plus, le solvant (solution aqueuse) est incompressible, d'où l'équation suivante :

$$\vec{\nabla} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = 0 \quad (3.7)$$

### Equation de Langevin de la membrane

Comme on ne s'intéresse qu'à la dynamique de la membrane, il est plus utile d'avoir une unique équation pour la membrane et éviter le calcul complet de la dynamique du fluide. En faisant une transformée de Fourier spatiale des équations précédentes et en éliminant  $v_z(\mathbf{r}_\perp, t)$  entre l'équation de Stokes et celle de Darcy on obtient une équation de Langevin qui ne modélise que les degrés de liberté correspondant à la membrane :

$$\begin{aligned} \frac{\partial u(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} + \tau_m^{-1} u(\mathbf{q}_\perp, t) &= \lambda_p [f_p(\mathbf{q}_\perp, t) + f_a(\mathbf{q}_\perp, t)] \\ &+ \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{[\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) + \mathbf{f}_{ad}(\mathbf{q}, t)] \cdot \mathbf{z}}{q^2} dq_z \end{aligned} \quad (3.8)$$

La résolution de cette équation permet de déterminer le spectre de fluctuations de la membrane, une fois qu'on a spécifié l'hamiltonien du système et les forces actives pertinentes.

### Equation de conservation des centres actifs

Dépendant de la façon dont sont pris en compte les centres actifs, il est parfois nécessaire d'introduire un (ou plusieurs) champs décrivant l'évolution de la concentration locale des inclusions. Il faut dans ce cas écrire une équation de conservation de ce champ, ce qui donne une deuxième (voir plusieurs) équation de Langevin :

$$\frac{\partial \psi(\mathbf{r}_\perp, t)}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j}(\mathbf{r}_\perp, t) + \nabla \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{r}_\perp, t) \quad (3.9)$$

$\mathbf{j}(\mathbf{r}_\perp, t)$  est le courant d'inclusions dans la membrane. Il est, en général, proportionnel au gradient du potentiel chimique des protéines  $\mu$  :

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}_\perp, t) = -\Lambda \nabla \mu e t \quad \mu = -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \phi} \quad (3.10)$$

avec  $\Lambda = D/\chi$  avec  $D$  coefficient de diffusion des inclusions, et  $\phi$  un champ correspondant à la concentration de protéines. La différence entre les champs  $\phi$  et  $\psi$  sera spécifiée dans la section 3.2.2 p. 57.  $\mathbf{f}_\psi(\mathbf{r}_\perp, t)$  est le bruit thermique vérifiant le théorème fluctuation-dissipation :

$$\langle \mathbf{f}_\psi(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle = 0 \quad (3.11)$$

$$\langle \mathbf{f}_{\psi i}(\mathbf{r}_\perp, t) \cdot \mathbf{f}_{\psi j}(\mathbf{r}'_\perp, t') \rangle = 2k_B T \Lambda^{-1} \delta_{ij} \delta(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp) \delta(t - t') \quad (3.12)$$

## 3.2 Modèles des canaux ioniques

### 3.2.1 Modèle Prost-Bruinsma. [Prost et Bruinsma, 1996]

La première approche théorique étudiant les membranes hors équilibre fut celle faite par J. Prost et R. Bruinsma dans [Prost et Bruinsma, 1996], qui considèrent le cas d'une membrane contenant des canaux ioniques. La membrane est modélisée par un hamiltonien de Helfrich :

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} \int d^2 \mathbf{r}_\perp [\kappa (\nabla^2 u)^2 + \sigma (\nabla u)^2] \quad (3.13)$$

Cette première modélisation considère que les canaux n'interagissent avec la membrane que par la force de perméation active, induite par l'activation hors équilibre des canaux. Cette force résulte du flux d'ions traversant les canaux ouverts, et possède les caractéristiques suivantes :

- La force est due à la perméation à travers le canal. Son amplitude  $F_j(t)$  fluctue ("shot noise").
- Le canal s'ouvre et se ferme de façon stochastique. La force de perméation s'applique donc sur des temps aléatoires.
- Le canal diffuse dans la membrane. Le point d'application de la force  $\mathbf{R}_j(t)$  change de manière stochastique.

La résultante des forces de perméation appliquée par l'ensemble des canaux s'écrit donc :

$$f_a(\mathbf{r}_\perp, t) = \sum_{j=1}^N F_j(t) \delta(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{R}_j(t)) \quad (3.14)$$

avec

$$\langle F_j(t) \rangle = F_a \quad (3.15)$$

$$\langle F_j(t).F_{j'}(t') \rangle = F_a^2 + \delta_{jj'}I(t-t') \quad (3.16)$$

$$I(t-t') = I_0 \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau}\right) \quad (3.17)$$

On en déduit que :

$$\langle f_a(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle = \rho F_a \quad (3.18)$$

$$\begin{aligned} \langle \delta f_a(\mathbf{r}_\perp, t). \delta f_a(\mathbf{r}'_\perp, t') \rangle &= F_a^2 G_{coll}(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp, t - t') \\ &+ I(t-t') G_{ind}(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp, t - t') \end{aligned} \quad (3.19)$$

avec :

$$\delta f_a(\mathbf{r}_\perp, t) = f_a(\mathbf{r}_\perp, t) - \langle f_a(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle \quad (3.20)$$

$$G_{coll}(\mathbf{r}_\perp, t) \propto \frac{\rho}{D_{coll}t} \exp(-\mathbf{r}_\perp^2/D_{coll}t) \quad (3.21)$$

$$G_{ind}(\mathbf{r}_\perp, t) \propto \frac{\rho}{D_{ind}t} \exp(-\mathbf{r}_\perp^2/D_{ind}t) \quad (3.22)$$

$D_{ind}$  étant le coefficient de diffusion d'une protéine unique, et  $D_{coll}$  celui de la diffusion collective (mesuré par les expériences de FRAP par exemple  $\simeq 10^{-12} m^2/s$ )<sup>1</sup>.

Ce modèle suppose l'existence d'un potentiel transmembranaire qui joue le rôle de la source d'énergie. Dans les systèmes biologiques dont s'inspire ce modèle (la membrane d'un neurone par exemple), ce potentiel est créé et maintenu par des pompes ioniques.

En spécifiant l'hamiltonien du système et la forme des forces actives, on peut dériver une équation de Langevin décrivant la dynamique de la membrane selon le schéma présenté dans la première section de ce chapitre :

$$\mathbf{f}_{ad}(\mathbf{q}, t) = 0 \quad (3.23)$$

$$\tau_m^{-1}(\mathbf{q}_\perp) = \left( \lambda_p + \frac{1}{4\eta q_\perp} \right) (\sigma q_\perp^2 + \kappa q_\perp^4) \quad (3.24)$$

La résolution de cette équation de Langevin donne le spectre de fluctuation suivant :

$$\begin{aligned} \langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle &= \frac{k_B T}{\kappa q_\perp^4 + \sigma q_\perp^2} + \tau_m(\mathbf{q}_\perp) \times \\ &\left[ \frac{\rho \lambda_p^2 F_a^2}{\tau_m^{-1}(\mathbf{q}_\perp) + D_{coll} q_\perp^2 / 4} + \frac{\rho \lambda_p^2 I_0}{\tau_m^{-1}(\mathbf{q}_\perp) + D_{ind} q_\perp^2 / 4 + \tau^{-1}} \right] \end{aligned} \quad (3.25)$$

<sup>1</sup>Ces deux coefficients sont différents si les protéines interagissent entre elles.

- Aux limites  $\sigma = 0$  et  $q_{\perp} \rightarrow 0$ , le spectre devient :

$$\langle |u(\mathbf{q}_{\perp})|^2 \rangle_{q_{\perp} \rightarrow 0} \simeq \frac{k_B T}{\kappa} [q_{\perp}^{-4} + \xi_{ne}^{-1} q_{\perp}^{-5}] \quad (3.26)$$

avec la distance  $\xi_{ne} = \frac{k_B T D}{16 \eta \rho \lambda_p^2 F_a^2}$ . On voit que pour des vecteurs d'onde petits comparés à  $\xi^{-1}$ , les effets hors-équilibre dominent les fluctuations thermiques.

- Aux limites  $q_{\perp} \rightarrow 0$  et  $\sigma \neq 0$ , le spectre devient :

$$\langle |u(\mathbf{q}_{\perp})|^2 \rangle = \frac{16 \eta \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\sigma q_{\perp}^2} + \frac{k_B T}{\sigma q_{\perp}^2} \quad (3.27)$$

Dans ce cas les fluctuations thermiques et les contributions actives ont la même loi de puissance. On peut réécrire cette expression en introduisant une température effective  $T_{eff}$ , toujours supérieure à la température thermodynamique  $T$  :

$$\langle |u(\mathbf{q}_{\perp})|^2 \rangle = \frac{k_B T_{eff}}{\sigma q_{\perp}} \quad (3.28)$$

$$T_{eff} = T + \frac{16 \eta \rho \lambda_p^2 F_a^2}{k_B \sigma} \quad (3.29)$$

Ce modèle prédit donc une amplification des fluctuations ainsi qu'une contribution dominante des effets hors équilibre aux grandes longueurs d'ondes (faibles  $q_{\perp}$ ). La longueur de persistance de la membrane, qui caractérise la corrélation spatiale de la direction normale à la bicouche, est fortement réduite par l'activité protéique.

### 3.2.2 Modèle RTP. [Ramaswamy *et al.*, 2000]

Le modèle Prost-Bruinsma ne prend pas en compte les couplages possibles entre la courbure de la membrane et l'activité des centres actifs. Cependant, les protéines transmembranaires ont souvent des formes qui peuvent être simplifiées en une forme conique tronquée. Ceci peut induire un couplage entre la courbure de la membrane et l'activité protéique. L'introduction d'une inclusion conique dans la membrane augmente l'aire des deux feuilletts composant la bicouche de manière asymétrique, ce qui se traduit par une courbure spontanée. Plus la courbure locale de la membrane est différente de cette courbure spontanée, plus l'énergie du système augmente. Les protéines ont tendance donc à diffuser vers les régions à la courbure proche de la courbure spontanée adaptée à leur forme [Leibler et Andelman, 1987].

Ces effets ont été pris en compte dans le modèle Ramaswamy-Toner-Prost (PRL) [Ramaswamy *et al.*, 2000]. Les auteurs ont introduit deux types d'inclusions correspondant aux deux orientations possibles d'une protéine transmembranaire  $\uparrow$  (de densité  $\rho^{\uparrow}(\mathbf{r}_{\perp}, t)$ ) et  $\downarrow$  (de densité  $\rho^{\downarrow}(\mathbf{r}_{\perp}, t)$ ). Dans la représentation de Monge, on peut définir aussi les concentrations projetées des protéines  $\phi^{\uparrow/\downarrow}(\mathbf{r}_{\perp}, t) = \rho^{\uparrow/\downarrow}(\mathbf{r}_{\perp}, t) \sqrt{1 + (\nabla u)^2}$ ,

ainsi que les concentrations totale  $\phi(\mathbf{r}_\perp, t) = \phi^\uparrow(\mathbf{r}_\perp, t) + \phi^\downarrow(\mathbf{r}_\perp, t)$  et vectorielle  $\psi(\mathbf{r}_\perp, t) = \phi^\uparrow(\mathbf{r}_\perp, t) - \phi^\downarrow(\mathbf{r}_\perp, t)$ .

Pour traiter ce système, il faut écrire un hamiltonien qui contient les couplages autorisés par la symétrie. Ces termes doivent être invariants dans l'inversion de l'orientation des pompes ( $(\uparrow, \downarrow) \rightarrow (\downarrow, \uparrow)$ ;  $(u, \psi, \phi) \rightarrow (-u, -\psi, \phi)$ ). On remarque que les couplages faisant intervenir  $\phi$  ne sont pas invariants par cette symétrie ( $u\phi \rightarrow -u\phi$ ;  $\psi\phi \rightarrow -\psi\phi$ ), de ce fait on ne considère que le champ  $\psi$  pour rendre compte de la dynamique des protéines dans la membrane. On utilise donc un hamiltonien qui s'écrit comme suit :

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{r}_\perp [\kappa(\nabla^2 u)^2 + \sigma(\nabla u)^2 + \chi(\psi - \psi_0)^2 - 2\Xi\psi\nabla^2 u] \quad (3.30)$$

Il est composé des termes de l'hamiltonien de "Helfrich" (termes de courbure et de tension), la compressibilité pour la concentration vectorielle des protéines  $\chi$ , ainsi qu'un terme de couplage entre la courbure  $\nabla^2 u$  et la concentration vectorielle  $\psi$ ,  $\Xi$  étant le coefficient caractérisant ce couplage.

Le calcul du spectre de fluctuation à l'équilibre thermodynamique montre que l'introduction des centres actifs conduit à une renormalisation (diminution) du module de courbure, qui devient  $\kappa_e = \kappa - \frac{\Xi^2}{\chi}$ . On voit que la membrane devient instable si le couplage de la protéine à la courbure est assez fort pour rendre  $\kappa_e$  négatif [Leibler et Andelman, 1987, Ramaswamy *et al.*, 2000].

Comme dans le modèle Prost-Bruinsma, chaque inclusion active exerce une force normale sur la membrane  $\epsilon F_a$  (qui dépend, dans ce modèle, de son orientation  $\epsilon = \pm 1$ ). Pour une membrane de courbure non nulle, la symétrie ( $u \rightarrow -u$ ;  $\epsilon \rightarrow -\epsilon$ ) autorise l'existence d'une contribution additionnelle à la force normale de la forme  $l_2 \nabla^2 u F_a$ . Cette force additionnelle traduit la sensibilité de l'activité protéique à la courbure de la membrane, quantifiée par une longueur caractéristique  $l_2$ . L'existence d'une telle sensibilité a été prouvée pour des canaux potassium mécanosensibles TREK et TRAAK, où les événements d'ouvertures sont directement liés au signe de la courbure de la membrane [Maingret *et al.*, 1999a, Maingret *et al.*, 1999b].

$$f_a(\mathbf{r}_\perp, t) = (\rho^\uparrow - \rho^\downarrow)F_a + (\rho^\uparrow + \rho^\downarrow)l_2\nabla^2 u F_a \quad (3.31)$$

Ce modèle ne prend pas en compte les forces actives exercées sur le solvant  $\mathbf{f}_{ad}(\mathbf{r}, t) = 0$ . Dans ces conditions, la dynamique de la membrane est décrite par deux équations de Langevin couplées :

$$\begin{aligned} \frac{\partial u(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} &\simeq \mu_p F_a n_0 \{ \psi(\mathbf{q}_\perp, t) + l_2 \nabla^2 u(\mathbf{q}_\perp, t) \} + V_{hyd} \\ &\quad - \mu_p \{ \kappa \nabla^4 u(\mathbf{q}_\perp, t) - \sigma \nabla^2 u(\mathbf{q}_\perp, t) - \Xi \nabla^2 \psi(\mathbf{q}_\perp, t) \} + f_h(\mathbf{q}_\perp, t) \end{aligned} \quad (3.32)$$

$$\frac{\partial \psi(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} \simeq \Lambda \chi \nabla^2 \psi(\mathbf{q}_\perp, t) - \Lambda \Xi \nabla^4 u(\mathbf{q}_\perp, t) + \nabla \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{q}_\perp, t) \quad (3.33)$$

avec  $V_{hyd} = - \int \frac{d\mathbf{q}_\perp}{(2\pi)^2} \frac{1}{4\eta q_\perp} \frac{\delta\mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{q}_\perp, t)} e^{i\mathbf{q}_\perp \cdot \mathbf{r}_\perp}$

En analysant ces équations, on remarque que si  $l_2$  ou  $\Xi$  est négatif et suffisamment grand en valeur absolue, la membrane devient instable. En partant d'une membrane plane, un  $\Xi$  élevé fait que des protéines de même signe vont se rassembler dans les régions à courbure favorable, et exercer des forces qui augmentent cette courbure. Un  $l_2$  élevé conduit à un mécanisme similaire, mais qui est dû au fait que les protéines situées dans des régions de courbure favorable vont être plus actives et exerceront des forces plus élevées.

Le calcul du spectre de fluctuations pour  $\sigma = 0$ , et  $q_\perp \ll \min[k_{max} = \frac{4\eta\lambda_p F_a n_0 \Xi}{\kappa\chi}; k_D = \frac{4\eta D}{\kappa}]$  donne :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{F_a n_0 (l_2 + \frac{\Xi}{\chi}) q_\perp^2 + \kappa_\epsilon q_\perp^4} + \frac{\lambda_p F_a}{D (l_2 + \frac{\Xi}{\chi}) q_\perp^4} \quad (3.34)$$

L'activité protéique de ce système induit, dans ces conditions, l'émergence d'une tension active  $F_a n_0 (l_2 + \frac{\Xi}{\chi})$  indépendante du paramètre de perméation  $\lambda_p$ , et d'un terme additionnel de même forme qu'un spectre passif à tension nulle ( $\sim q_\perp^{-4}$ ), mais dépendant de l'amplitude des forces actives, et des coefficients de couplages à la membrane. Ces termes sont proportionnels à  $l_2 + \frac{\Xi}{\chi}$  qui traduit les couplages de la concentration et de l'activité de la protéine à la courbure. Le cas où ce terme est nul correspond au modèle Prost-Bruinsma. On retrouve, dans ce cas, le comportement en  $q_\perp^5$  présenté dans la section précédente (équation 3.26).

Pour une membrane avec une tension non nulle  $\sigma$ , le comportement décrit par l'équation 3.34 reste valable pour des vecteurs d'onde supérieurs à un vecteur d'onde de coupure  $k_{min} = \frac{\sigma}{\kappa k_{max}}$ .

Ce modèle prévoit aussi l'apparition d'ondes propagatives dans certaines conditions :

- Un net excès de protéines dans une des deux directions ( $\langle \psi_0 \rangle \neq 0$ ), oblige à prendre en compte un terme du type  $\frac{\lambda_p F_a}{n_0} \psi_0^2 \nabla^2 u$  dans l'équation de Langevin linéarisée de  $\psi$ .
- Pour une distribution équilibrée entre les deux orientations ( $\langle \psi_0 \rangle = 0$ ), la présence de fluctuations de densité  $\langle \psi^2 \rangle \neq 0$  induit des ondes (dites ondes de Ramaswamy) se propageant à une vitesse  $c = \lambda_p F_a \langle \psi^2 \rangle^{1/2}$ .

Il est à noter que ces ondes n'apparaissent que pour des vecteurs d'ondes  $q_\perp < q_\perp^{fluc} \equiv \sqrt{\frac{\lambda_p F_a \langle \psi^2 \rangle}{n_0 D l_2}}$ .

Pour résumer, ce modèle prévoit que l'activité protéique amplifie les fluctuations membranaires jusqu'à pouvoir déstabiliser la membrane dans certaines conditions. Pour les cas d'une membrane stable, les fluctuations additionnelles se comportent en  $q^{-4}$ , et peuvent être assimilées à des fluctuations à une température effective plus élevée.

## 3.3 Modèles avec dipôle hydrodynamique

### 3.3.1 Modèle RTP avec dipôle hydrodynamique

Au cours de leur cycle de pompage, les pompes ioniques transmembranaires ont des changements de conformations qui varient d'une protéine à l'autre. Ces mouvements moléculaires peuvent exercer des forces à la fois sur la membrane qui contient la protéine, et sur le fluide qui l'entoure. Le modèle RTP présenté dans la section précédente ne considère pas ces forces actives exercées par les protéines directement sur le fluide. Nous allons présenter dans ce qui suit l'extension de ce modèle, développée par [Manneville *et al.*, 2001], pour inclure ces effets.

On considère dans ce modèle deux types de forces actives :

- les forces appliquées directement par la protéine sur la membrane, et qui sont liées à la perméation.

$$f_a(\mathbf{r}_\perp, t) = F_a \psi(\mathbf{r}_\perp, t) + l_2 F_a \phi \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t) \quad (3.35)$$

- les forces hydrodynamiques appliquées par les centres actifs sur le solvant (nommées  $\mathbf{f}_{ad}(\mathbf{q}, t)$ ). Le système membrane-pompes-solvant ne subit aucune force externe. La résultante des forces exercées sur ce système doit être nulle et la densité de forces associées aux pompes ne peut pas contenir de termes monopolaires. On modélise donc ces forces par un dipôle hydrodynamique orienté selon la normale  $\mathbf{z}$ , et de taille  $w = w^\uparrow + w^\downarrow$  (on néglige les termes multipolaires d'ordre supérieur) :

$$F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \psi(\mathbf{r}_\perp, t) \mathbf{z} \quad (3.36)$$

On ajoute également un terme dipolaire qui tient compte du couplage entre l'activité protéique et la courbure de la membrane :

$$l_2 F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \phi \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t) \mathbf{z} \quad (3.37)$$

La dynamique de la membrane est modélisée par deux équations de Langevin couplées. La première décrivant l'évolution de la hauteur  $u(\mathbf{q}_\perp, t)$  :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} + \tau_m^{-1} u(\mathbf{q}_\perp, t) = \beta \psi(\mathbf{q}_\perp, t) \lambda_p f_p(\mathbf{q}_\perp, t) + \frac{1}{2\eta\pi} \int dq_z \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \mathbf{z}}{q^2} \quad (3.38)$$

avec

$$\tau_m^{-1} = \left( \lambda_p + \frac{1}{2\eta q_\perp} \right) (\kappa q_\perp^4 + \sigma q_\perp^2) + \phi \lambda_p l_2 F_a q_\perp^2 - l_2 \mathcal{P}_a w \phi \frac{q_\perp^3}{4\eta} \quad (3.39)$$

$$\beta = \lambda_p \bar{F}_a - \Xi q_\perp^2 \left( \lambda_p + \frac{1}{2\eta q_\perp} \right) - \mathcal{P}_a w \frac{q_\perp}{4\eta} \quad (3.40)$$

où  $\bar{F}_a = F_a - 2k_B T \dot{a} / D_{ions} q$  provient du terme de pression osmotique, à le taux de pompage de la protéine,  $D_{ions}$  le coefficient de diffusion des ions dans le solvant,  $\mathcal{P}_a = F_a \frac{w^{\dagger 2} - w^{\ddagger 2}}{w}$ , le dipôle de force actif avec  $w$  la taille de la protéine.

La seconde équation de Langevin décrit la dynamique des protéines incluses dans la membrane :

$$\frac{\partial \psi(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} + \tau_\psi^{-1} \psi(\mathbf{q}_\perp, t) = \gamma u(\mathbf{q}_\perp, t) - i \mathbf{q}_\perp \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{q}_\perp, t) \quad (3.41)$$

avec

$$\tau_\psi^{-1} = \Lambda \chi q_\perp^2 = D q_\perp^2 \quad (3.42)$$

$$\gamma = -\Lambda \Xi q_\perp^4 \quad (3.43)$$

La résolution de ce système d'équations donne le spectre de fluctuations suivant [Manneville *et al.*, 2001] :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{(\tau_m^{-1} + \tau_\psi^{-1})(\tau_m^{e-1} + \tau_a^{-1})} \times \left[ \frac{1}{\chi} \left( \lambda_p \bar{F}_a - \mathcal{P}_a w \frac{q_\perp}{4\eta} \right)^2 + (\tau_m^{-1} + \tau_\psi^{-1} - \tau_a^{-1}) \left( \lambda_p + \frac{1}{2\eta q_\perp} \right) \right] \quad (3.44)$$

avec

$$\tau_a^{-1} = \frac{\Xi}{\chi} q_\perp^2 \left( \lambda_p \bar{F}_a - \mathcal{P}_a w \frac{q_\perp}{4\eta} \right) \quad (3.45)$$

Pour une vésicule géante contenant des pompes ioniques, un calcul d'ordre de grandeur permet de simplifier l'expression du spectre en négligeant : les effets de perméation face à la relaxation hydrodynamique, la contribution de la pression osmotique face à l'effet des dipôles hydrodynamiques, ainsi que les effets de la diffusion des protéines. On obtient au final l'expression suivante :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{\kappa_a^e q_\perp^4 + \sigma q_\perp^2} + \frac{k_B T \mathcal{P}_a w \Xi_a}{\chi (\kappa_a q_\perp^2 + \sigma) (\kappa_a^e q_\perp^2 + \sigma)} \quad (3.46)$$

Avec  $\Xi_a = \Xi + \mathcal{P}_a w$  et  $\kappa_a^e = \kappa^e - l_2 \mathcal{P}_a w \phi - \mathcal{P}_a w \Xi \phi / k_B T$ .

Cette expression donne une température effective de la forme :

$$T_{eff} = \frac{\kappa^e}{\kappa_a^e} \left( 1 + \frac{\mathcal{P}_a w \Xi_a}{\kappa_a \chi} \right) T \quad (3.47)$$

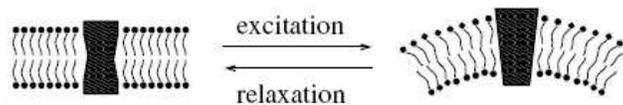
On voit que les effets hors équilibre dépendent de façon cruciale du coefficient de couplage des protéines à la courbure  $\Xi$ , ainsi que de l'amplitude du dipôle hydrodynamique  $\mathcal{P}_a$ .

Les forces actives qu'exercent les protéines directement sur le solvant induisent une amplification des fluctuations de la membrane. Dans le cas d'une membrane contenant des canaux ioniques, les effets de perméation dominent l'effet des dipôles hydrodynamiques. Cependant, les pompes ioniques ont une cadence de transport 1000 fois plus faible que les canaux. Dans ce cas, l'amplification due aux dipôles hydrodynamiques domine les effets de perméation [Manneville *et al.*, 2001].

### 3.3.2 Influence de l'état interne des inclusions sur la dynamique des membranes actives

#### Modèle H. Chen. [Chen, 2004]

H. Chen propose de modéliser l'influence des degrés de liberté internes des inclusions sur la dynamique des membranes actives. Il considère l'exemple où l'activation des protéines (de même orientation dans la membrane) induit un changement de sa forme (voir exemple de la figure 3.1). Cela revient à considérer que le couplage  $\Xi$  entre la densité de protéines et la courbure de la membrane change lorsque la protéine transite de l'état inactivé à l'état activé. Ce modèle prend en compte les forces de perméation et les effets hydrodynamiques dipolaires de la même manière que dans le paragraphe précédent 3.3.1.



**Fig. 3.1.** Schéma d'une inclusion (modélisant une protéine transmembranaire) dans différents états conformationnels. Dans cet exemple, l'état de base de l'inclusion a une forme symétrique qui n'impose pas de courbure, tandis que l'état excité, avec sa forme conique, impose une forte courbure à la membrane. [Chen, 2004]

Ce modèle prédit des instabilités, provoquées par l'activité protéique, similaires à celles issues du modèle RTP. L'influence des degrés de liberté internes des inclusions n'induit pas de changement dans les lois de puissances gouvernant les spectres de fluctuations, à part l'expression de la température effective qui est modifiée par ces transitions additionnelles. Une autre prédiction intéressante de ce modèle est l'apparition de domaines riches en inclusions, de taille finie contrôlée par l'activité protéique. Ce résultat est à relier à l'observation, dans les membranes cellulaires, de domaines de taille nanométrique. Ces nanodomains, appelés "raft", sont enrichis en certains types de protéines et de lipides. L'agrégation active prédite par ce modèle pourrait être un mécanisme intervenant dans la formation ou la stabilisation de ces "raft".

**Modèle Lacoste-Lau. [Lacoste et Lau, 2005]**

Une autre approche prend également en compte l'état interne des centres actifs. D. Lacoste et A. Lau ont étudié la dynamique des membranes actives et plus particulièrement la fonction d'autocorrélation temporelle d'un point de la membrane. Dans cette approche, on prend en compte à la fois le "shot noise" comme dans le modèle Prost-Bruinsma (qui ignore le couplage à la courbure) et le couplage à la courbure comme dans le modèle RTP (qui ignore le bruit de "shot noise"). Prendre en compte le bruit de "shot noise" dans le modèle RTP revient à traiter  $F_a$  et  $l_2 F_a$  de l'équation 3.35 comme variables fluctuantes dans le temps du fait de l'activité protéique.

Une analyse de la fonction de corrélation

$$\langle \Delta u^2(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle = \langle [u(\mathbf{r}_\perp, t) - u(\mathbf{r}_\perp, 0)]^2 \rangle$$

dans le modèle RTP montre un comportement sous-diffusif en l'absence de perméation, et surdiffusif aux temps courts si la perméation domine (résultats similaires à ceux de [Granek et Pierrat, 1999]). La perméation est négligeable pour une membrane contenant des pompes ioniques [Manneville *et al.*, 2001]. On n'attend donc pas de surdiffusion dans le modèle RTP pour un tel système. Cela veut dire qu'une expérience de micro-rhéologie (qui mesure  $\langle \Delta u^2(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle$ ) ne permettrait pas de distinguer une membrane active d'une membrane passive. La situation est toute autre si on utilise un modèle incluant le shot noise ou des transitions entre deux états résultant d'un bruit chimique.

Le modèle RTP considère que l'amplitude des forces actives reste constante, alors qu'elle peut fluctuer. Ces fluctuations sont ce qu'on appelle le bruit de "shot-noise". Ce bruit conduit à une amplification additionnelle des fluctuations aux échelles de longueurs de l'ordre de l'épaisseur de la membrane  $w$ , et à l'apparition d'une dépendance de la température effective à la viscosité du solvant, ce qui n'était pas le cas dans le modèle RTP. On a également une forte contribution de l'activité à la fonction d'autocorrélation temporelle aux temps courts, qui était absente dans le modèle RTP, mais on n'a pas de phénomène de surdiffusion de la membrane.

En s'inspirant du modèle à deux états de H. Chen [Chen, 2004], les auteurs ont développé une autre approche pour rendre compte du "shot noise" où ils donnent aux protéines la possibilité de transition, de manière stochastique, entre un état "on" où elles exercent des forces actives, et un état "off" où elles sont inactives. Le calcul de la fonction d'autocorrélation dans les conditions dominées par les effets hydrodynamiques montre l'existence d'un phénomène de sur diffusion de la membrane aux temps courts, similaire au cas des systèmes dominés par les effets de perméation. Cette contribution active domine les autres contributions à la fonction d'autocorrélation. Une expérience de micro-rhéologie serait donc capable de détecter la contribution active liée aux degrés de liberté internes des éléments actifs.

### 3.3.3 Dipôle hydrodynamique symétrisé

Dans les modèles exposés jusqu'à présent, l'action directe des centres actifs sur le solvant est modélisée par un dipôle hydrodynamique, qui correspond au premier ordre d'un développement multipolaire de la force, et qui s'écrit :

$$(F_a \psi(\mathbf{r}_\perp, t) + l_2 F_a \phi \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t)) [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \quad (3.48)$$

[Sankararaman *et al.*, 2002, Lomholt, 2006b] ont fait remarquer que cette expression n'est pas invariante par inversion des deux côtés de la membrane ( $\uparrow \rightleftharpoons \downarrow$ ). Ils ont proposé une nouvelle expression pour ce terme dipolaire qui est invariante par cette symétrie :

$$\begin{aligned} & (F_a + l_2 F_a \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t)) n^\uparrow(\mathbf{r}_\perp, t) [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \\ & + (F_a - l_2 F_a \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t)) n^\downarrow(\mathbf{r}_\perp, t) [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \end{aligned} \quad (3.49)$$

Le modèle de [Sankararaman, et al.] se propose d'étudier la dynamique des membranes actives confinées (au voisinage d'une paroi). Le remplacement, dans ce modèle, de l'expression du dipôle hydrodynamique par le dipôle symétrisé fait apparaître un terme additionnel proportionnel à  $\phi$  (concentration totale en protéine) dans les expressions des vitesses hydrodynamiques. Cependant, le comportement à grandes longueurs d'onde d'une membrane près d'une paroi n'en est pas modifié. Les prédictions de cette approche seront résumées dans la section sur les membranes confinées. Nous allons présenter dans la suite le modèle développé par M. Lomholt.

### 3.3.4 Dipôle hydrodynamique normale symétrisé. Modèle de M. Lomholt

Le modèle développé par M. Lomholt se base sur une approche formelle exposée dans [Lomholt *et al.*, 2005, Lomholt, 2006b]. Cette approche permet de s'affranchir de la résolution des équations hydrodynamiques des systèmes membranaires en trois dimensions, en traitant la membrane comme une surface mathématique d'épaisseur nulle. Toutes les contraintes qu'elle exerce sur le solvant environnant (et qui, à son tour, agit sur la membrane) interviennent comme des contraintes s'appliquant directement sur la membrane. La dynamique du solvant pertinente pour le comportement de la membrane est donc incluse directement dans l'équation dynamique de celle-ci et dans les conditions aux limites du solvant.

L'action des centres actifs sur le solvant est modélisée par une densité de force dirigée selon la normale à la membrane (et non pas selon  $\mathbf{z}$  comme c'était le cas dans les autres modèles) :

$$\mathbf{F}_{act}(\mathbf{r}_\perp) = \int_M dA \int dh F_{act} \mathbf{n} \delta^3[\mathbf{r} - (\mathbf{R} + h\mathbf{n})] \quad (3.50)$$

où  $h$  est la distance à la membrane selon la direction normale. Elle correspond à  $z$  dans les modèles précédents. La première intégration est une intégrale sur la surface de la membrane.

Lomholt a conduit ses calculs sans spécifier une expression particulière pour  $F_{act}$ . On rappelle que les modèles prenant en compte les dipôles hydrodynamiques ([Manneville *et al.*, 2001, Sankararaman *et al.*, 2002, Lacoste et Lau, 2005, Chen, 2004]) correspondaient au choix :

$$F_{act}(h) \sim F_a [\delta(h - w^\uparrow) - \delta(h - w^\downarrow)]$$

Il en a déduit que l'activité des centres actifs induit des contraintes sur la surface représentant la membrane qui peuvent s'exprimer en fonction :

- d'une tension active  $\sigma_{dip}$  qui n'est autre que le moment dipolaire de la force active :

$$\sigma_{dip} = \int dh h F_{act}(h) \quad (3.51)$$

- du moment quadripolaire de  $F_{act}$  :

$$\mathcal{Q} = \int dh h^2 F_{act}(h) \quad (3.52)$$

qui induit une renormalisation du module de courbure.

Cette approche a permis à M. Lomholt de calculer la dynamique d'une membrane en géométrie sphérique (correspondant au cas d'une vésicule) [Lomholt, 2006a]. En se basant sur un hamiltonien similaire à celui du modèle RTP, et en incluant le bruit shot noise, il a calculé le spectre de fluctuations d'une membrane sphérique en utilisant des harmoniques sphériques :

$$\langle |u_{lm}|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\tilde{E}_l^e} \left\{ 1 + \left[ \frac{F_{(2)}(F_{(2)} - \Xi)}{\chi} + \frac{\Gamma_a n_{0,\Sigma}}{k_B T} x_l \right] \times \frac{(l+2)^2(l-1)^2}{4\tilde{E}_l(1 + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_{D,l}})} \right\} \quad (3.53)$$

Avec

$$\tilde{E}_l = [\kappa l(l+1) + \tilde{\sigma} R_0^2](l+2)(l-1) \quad (3.54)$$

$$\tilde{E}_l^e = [\tilde{\kappa}^e l(l+1) + \tilde{\sigma}^e R_0^2](l+2)(l-1) \quad (3.55)$$

$$\tilde{\sigma} = \sigma_{0,\phi} + \sigma_{0,dip} \quad (3.56)$$

$$\tilde{\kappa}^e = \kappa - \frac{\Xi(\Xi - F_{(2)})}{4\chi} \quad (3.57)$$

$$\tilde{\sigma}^e = \tilde{\sigma} + \frac{\Xi(\Xi - F_{(2)})}{2R_0^2\chi} \quad (3.58)$$

$$\tau_{\kappa,l} = \frac{\eta R_0^3(4l^3 + 6l^2 - l)}{\tilde{E}_l l(l+1)} \quad (3.59)$$

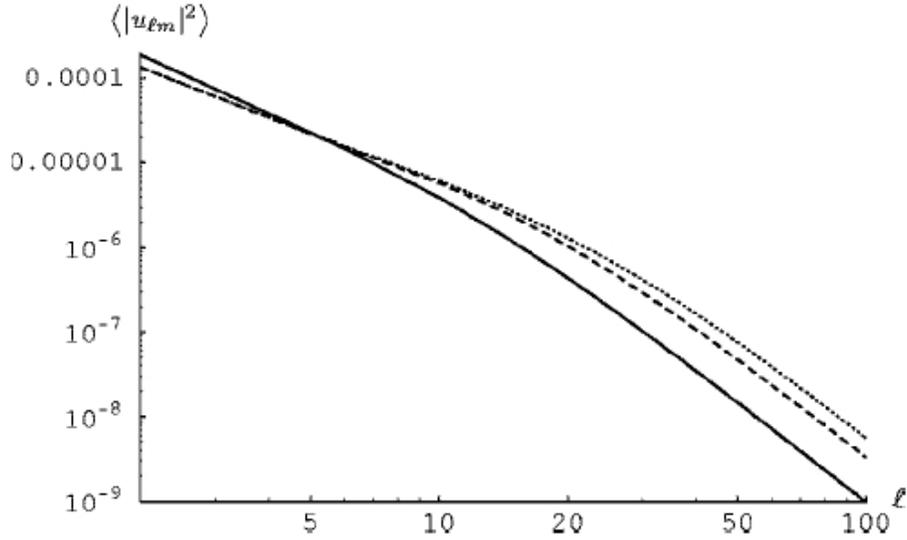
$$\tau_{D,l} = \frac{R_0^2}{D_{\Delta\Delta} l(l+1)} \quad (3.60)$$

$$x_l = \frac{\tilde{E}_l^e + \frac{\tau_l}{\tau_{D,l}} \left(1 + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_{D,l}}\right) \tilde{E}_l + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_{D,l}} \tilde{E}_l}{\left(1 + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_{D,l}}\right) \tilde{E}_l + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_l} \tilde{E}_l + \frac{\tau_l}{\tau_{D,l}} \tilde{E}_l^e} \quad (3.61)$$

Le paramètre  $F_{(2)}$  est proportionnel à  $\mathcal{Q}$ . Il est relié au moment dipolaire du modèle RTP par la relation  $F_{(2)} = 2w\mathcal{P}_a$  où  $w \propto 5 \cdot 10^{-9} m$  est l'épaisseur de la membrane. Les expériences de micropipettes permettent d'estimer  $\mathcal{P}_a$  à  $10k_B T$  [Manneville *et al.*, 1999, Girard *et al.*, 2004b]. On peut donc estimer  $F_{(2)}$  à  $4 \cdot 10^{-28} J.m$ .  $\Gamma_a$  est un paramètre décrivant le bruit interne de la protéine, qui s'exprime par une fluctuation de l'amplitude de l'action de celle-ci sur le fluide environnant. Il n'y a aucune mesure de ce paramètre. Il est donc estimé comme égal à  $F_{(2)}^2$ . En utilisant des valeurs des paramètres physiques correspondant aux expériences réalisées par J.B. Manneville [Manneville *et al.*, 1999], on peut tracer ce spectre pour estimer la contribution de  $\sigma_{dip}$ ,  $F_{(2)}$ , et  $\Gamma_a$ . La valeur de  $\sigma_{dip}$  est indépendante des autres paramètres, et est choisie comme égale à  $\frac{1}{2}\sigma_{0,\phi}$ . Les paramètres restants sont fixés aux valeurs suivantes :  $\kappa = 10k_B T$ ,  $\sigma_{0,\phi} = 5 \cdot 10^{-8} N/m$ , le rayon de la vésicule  $R_0 = 10 \mu m$ ,  $\xi = k_B T / \phi_0$  avec la densité totale de protéine  $\phi_0 = 10^{16} m^{-2}$ ,  $D_{\Delta\Delta} = 10^{-12} m^2/s$  coefficient de diffusion des protéines. La figure 3.2 permet de conclure que  $\sigma_{dip}$  modifie essentiellement les premiers modes, tandis que  $F_{(2)}$  et  $\Gamma_a$  interviennent plutôt pour les grands modes de fluctuations. On s'attendrait à voir une réduction de l'amplitude des fluctuations à petits vecteurs d'onde (due à l'augmentation de  $\sigma$ ) et à une augmentation à grands vecteurs d'onde gouvernée par  $F_{(2)}$  et  $\Gamma_a$ .

On peut aller plus loin dans cette approche en spécifiant une forme particulière pour  $F_{act}$ . L'expression du dipôle hydrodynamique non-symétrisée (modèle RTP) conduit à l'expression suivante pour la tension active :

$$\sigma_{dip} = (w^\uparrow + w^\downarrow)(F_a \psi_0 + l_2 F_a \nabla^2 u(\mathbf{r}_\perp, t) \phi_0) \quad (3.62)$$



**Fig. 3.2.** Simulation de spectres actifs issus de la théorie de Lomholt. La courbe continue correspond à un spectre passif [ $\sigma_{dip} = 0$ ,  $F_{(2)} = 0$ , et  $\Gamma_a = 0$ ]. La courbe en tirets correspond à un spectre actif sans "shot noise" [ $\Gamma_a = 0$ ]. La courbe en pointillés correspond à un spectre actif avec "shot noise". Les valeurs des paramètres utilisés sont détaillées page 65.

Pour une membrane plane et une distribution symétrique des protéines  $\psi_0 = 0$ , on trouve une tension  $\sigma_{dip} = 0$ . Ceci est cohérent avec les prédictions du modèle RTP.

Cependant, nous avons vu précédemment que l'expression du dipôle doit être invariante par inversion des deux côtés de la membrane. Si  $F_{act}$  est pris égale à l'expression symétrisée du dipôle, la tension active devient :

$$\sigma_{dip} = (w^\uparrow + w^\downarrow)(F_a\phi_0 + l_2F_a\nabla^2u(\mathbf{r}_\perp, t)\psi_0) \quad (3.63)$$

On voit qu'on a toujours un terme de tension active qui dépend essentiellement de l'activité protéique. Bien que les deux formes de dipôle donnent des expressions différentes pour cette tension active, elles conduisent à la même expression pour le terme quadripolaire :

$$\mathcal{Q} = [(w^\uparrow)^2 - (w^\downarrow)^2](F_a\psi_0 + l_2F_a\nabla^2u(\mathbf{r}_\perp, t)\phi_0) \quad (3.64)$$

Pour estimer la variation de la tension membranaire, on utilise la valeur du dipôle hydrodynamique, estimée dans [Manneville *et al.*, 2001], qui est liée à la force  $F_a$  par la relation :  $\mathcal{P}_a = F_a \frac{(w^\uparrow)^2 - (w^\downarrow)^2}{2w}$ . On en déduit que :

$$\sigma_{dip} \simeq F_a(w^\uparrow + w^\downarrow)\phi_0 \simeq 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ N/m} \quad (3.65)$$

Cette valeur de la tension est très élevée, et est de l'ordre de la tension d'ouverture de pores pour une bicouche lipidique. Cette prédiction indique que la modélisation de la force active par un dipôle unique dirigé selon  $\mathbf{z}$  du modèle RTP, même si on utilise la forme symétrisée, ne donne pas une valeur réaliste de  $\sigma_{dip}$ . En effet, une tension de l'ordre de  $10^{-3} N/m$  conduit à la rupture de la membrane. Des valeurs plus faible (jusqu'à  $10^{-6} N/m$ ) conduiraient à la suppression des fluctuations de la vésicule à l'échelle optique lors de l'activation des centres actifs. Cependant, de tels phénomènes n'ont pas été observés expérimentalement. Ce qui suggère que  $\sigma_{dip}$  est petit ( $< \text{quelques } 10^{-7} N/m$ ). Il est raisonnable de penser à ce stade que cette modélisation est trop simpliste, mais qu'une distribution de force plus complexe pourrait être compatible avec une faible tension active (qui est le premier moment de la distribution), et avec un moment d'ordre deux de l'ordre de celui mesuré par l'expérience de micropipettes.

Pour résumer, ce modèle prévoit une modification de la tension membranaire due à l'activité, ainsi qu'une amplification des fluctuations. On s'attend donc à ce que les effets hors équilibre modifient le spectre de fluctuations de ces membranes actives à la fois aux grandes et petites longueurs d'onde.

### 3.4 Modèles à couplages implicites

N. Gov a développé une approche théorique [Gov, 2004] où il prend en compte les forces actives agissant sur la membrane directement sans modéliser la dynamique du fluide environnant. Ainsi, il introduit un bruit coloré  $\xi(t)$  dans l'équation de Langevin modélisant la dynamique de la membrane :

$$\dot{u}(t) + \omega_q u(t) = \xi(t) \quad (3.66)$$

avec  $\omega_q = \frac{\kappa q^4 + \sigma q^2}{4\eta q}$ . La nature du bruit  $\xi(t)$ , de moyenne nulle, et en particulier sa corrélation temporelle, détermine les couplages pris en compte dans le modèle :

- Cas de la force directe, où la force active  $F$  est directement couplée à l'amplitude de fluctuations  $u(t)$ . Dans ce cas la fonction de corrélation de  $\xi(t)$  s'écrit :

$$\langle \xi(0) \cdot \xi(t) \rangle = \left( \frac{F}{4\eta q} \right)^2 \frac{n}{2} e^{-|t|/\tau} \quad (3.67)$$

avec  $n$  densité des centres actifs.

- Cas de la force de courbure, où la force active  $F$  est couplée à la courbure locale de la membrane. Ce couplage est pris en compte en remplaçant  $F^2$  par  $F_r^2(qr)^4$  dans la fonction de corrélation temporelle de  $\xi(t)$ .

Le modèle de force directe correspond au cas où les éléments actifs exercent directement une action sur la membrane (comme c'est le cas des inclusions actives ou le cytosquelette). La force de courbure correspond au cas où l'activité de l'inclusion induit

Force active	limite q	$\sigma = 0$	$\sigma \neq 0$
Directe	$q \rightarrow 0$	$(F^2 n \tau / 8 \eta \kappa) q^{-5}$	$(F^2 n \tau / 16 \eta \sigma) q^{-3}$
Directe	$q \rightarrow \infty$	$(F^2 n / 2 \kappa^2) q^{-8}$	$(F^2 n / 8 \sigma^2) q^{-4}$
Courbure	$q \rightarrow 0$	$F_r^2 n r^4 \tau / 8 \eta \kappa) q^{-1}$	$(F_r^2 n r^4 \tau / 16 \eta \sigma) q$
Courbure	$q \rightarrow \infty$	$(F_r^2 n r^4 / 2 \kappa^2) q^{-4}$	$(F_r^2 n r^4 / 8 \sigma^2)$

**Tab. 3.1.** Termes dominants des spectres de fluctuations dans différentes limites, pour les modèles de force directe et à courbure, développés par N. Gov. [Gov, 2004]

une courbure de la membrane. Il semblerait que c'est le cas pour la bactériorhodopsine (BR) où des mesures sur les membranes pourpres (membrane native de la BR), montrent que l'activation de la BR induit l'apparition d'une courbure spontanée de la membrane avec un rayon  $r \sim 250 - 350 \text{ nm}$  [Porschke, 2003]. Dans ce cas, les changements conformationnels des centres actifs durant leur cycle, favorisent alternativement des courbures locales différentes, ce qui produit une source de bruit hors équilibre.

Le calcul du spectre de fluctuations  $\langle |u(q)|^2 \rangle$  dans les différentes conditions de forces actives et de tensions considérées dans ce modèle donne les résultats résumés dans le tableau 3.1.

N. Gov a développé cette approche simplifiée pour expliquer la dépendance des effets hors équilibre avec la viscosité du solvant environnant. Les expériences de J. B. Manneville, que nous allons présenter dans le chapitre suivant, ont montré que l'augmentation de la viscosité, par addition de glycérol, réduit la valeur du rapport  $\frac{T_{act}}{T}$ . Les deux approches développées donnent des dépendances à la viscosité du solvant cohérentes avec les mesures expérimentales. Cependant cette réduction d'activité pourrait aussi venir du fait que le glycérol inhibe l'activité de pompage de la BR. On en conclut que l'on ne peut faire la part de ce qui vient de l'augmentation de la viscosité et ce qui est dû à l'effet inhibiteur du glycérol.

Le modèle de N. Gov présenté jusqu'ici considère le bruit actif non corrélé spatialement et statistiquement identique pour tous les points de la membrane. Ceci revient à trop simplifier le système en négligeant la diffusion des centres actifs. [Lin *et al.*, 2006] ont étendu ce modèle en introduisant plusieurs aspects additionnels, principalement la diffusion, et différentes manières de modéliser les centres actifs : (i) modèle à 3 états où la force active est soit selon  $\uparrow$ ,  $\downarrow$ , ou nulle, (ii) modèle à 2 états avec 2 types de centres actifs, l'un appliquant une force active selon  $\uparrow$  dans l'état activé et nulle dans l'état non-activé, et l'autre l'applicant selon  $\downarrow$  dans l'état activé et nulle dans l'état non-activé. Cette étude met en évidence que l'influence de la viscosité sera importante si le temps de relaxation élastique de la membrane est plus grand que le temps de diffusion des centres actifs. Dans le cas contraire les effets hors équilibre sont indépendants de la viscosité et des propriétés diffusives des protéines.

## 3.5 Dynamique de membranes actives près d'une paroi

Nous avons présenté dans les sections précédentes plusieurs modèles décrivant la dynamique de membranes actives libres. Le cas des membranes actives dans un milieu confiné est lui aussi digne d'intérêt, car il permet de prévoir le comportement d'une cellule au voisinage d'une paroi ou d'une autre cellule, et de comprendre le comportement de structures lipidiques hors équilibre à haut taux de confinement, telles que les multilamellaires actifs. Ces effets de confinement peuvent être pris en compte théoriquement, en étudiant le comportement d'une membrane près d'une paroi.

Une membrane à l'équilibre près d'une paroi est soumise à une pression répulsive, appelée pression de Helfrich. Cette pression est due au fait que la paroi, qui se trouve à une distance  $d$ , réduit le nombre de conformations possibles de la membrane. De ce fait, l'entropie de celle-ci est réduite. En d'autres termes, la présence de la paroi augmente l'énergie du système, d'où l'émergence de cette force entropique répulsive, qui s'écrit :

$$P(d) \propto \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^3} \quad (3.68)$$

L'équipartition de l'énergie à l'équilibre thermodynamique assure que le temps de relaxation des fluctuations et leurs amplitudes sont de telle sorte que l'énergie de chaque degré de liberté est égale à  $k_B T$ . Dans un système hors équilibre, ce principe d'équipartition n'est plus valable et on peut avoir une amplification des fluctuations par rapport à l'état d'équilibre provoquée par le confinement.

La première étude traitant ce problème pour des membranes hors équilibre, a été conduite par J. Prost, JB. Manneville, R. Bruinsma [Prost *et al.*, 1998]. Elle se base sur le modèle Prost-Bruinsma pour décrire la dynamique de la membrane. On rappelle que ce modèle ne considère que les forces actives de perméation, et ne prend pas en compte les couplages des protéines à la courbure de la membrane et les effets de dipôle hydrodynamique. La description détaillée de ce système nécessite la résolution d'équations hydrodynamiques non-linéaires. Pour contourner cet obstacle, les auteurs ont choisi de quantifier les interactions entre la membrane et la paroi par une méthode d'analyse d'échelle. Cette approche prévoit une amplification des fluctuations, due au confinement, qui dépend de la tension membranaire et de la nature des bruits actifs considérés (Shot-noise, ou fluctuations de concentrations des centres actifs). Les facteurs d'amplification de l'amplitude  $\langle u^2(L) \rangle$  des fluctuations pour une membrane de taille  $L$ , sont donnés dans le tableau 3.2.

Cette étude prouve que, dans le cadre du modèle Prost-Bruinsma, l'activité hors équilibre induit une amplification additionnelle des fluctuations de la membrane dans un milieu confiné. Ceci se traduit par une pression de type Helfrich mais active.

Ce modèle est adapté au cas des canaux ioniques, mais pas au cas des pompes ioniques. Pour cela, il faut modéliser la membrane par une approche qui prend en

	$\sigma \neq 0$	$\sigma = 0$
Shot-noise	$(L/d)^3$	$(L/d)^3$
Fluctuations de concentration	$(L/d)^6$	$(L/d)^3$

**Tab. 3.2.** Facteur d'amplification de l'amplitude de fluctuations en présence d'une paroi à la distance  $d$  de la membrane de taille  $L$ . [Prost et al., 1998]

compte l'action directe des protéines sur le solvant. [Sankararaman *et al.*, 2002] ont adopté cette approche et ont modélisé la membrane par une version simplifiée du modèle RTP avec dipôle hydrodynamique. Ils ont considéré la membrane comme imperméable et ont négligé le couplage entre l'activité protéique et la courbure de la membrane. Pour pouvoir étudier la dynamique de la membrane près d'une paroi, ils ont aussi linéarisé les équations hydrodynamiques de ce système.

L'un des résultats importants de cette étude est la réduction des fluctuations d'une membrane active, de taille  $L$ , près d'une paroi, ce qui va à l'encontre des résultats du modèle Prost-Manneville-Bruinsma. En effet, à tension nulle, l'amplitude de ces fluctuations  $\langle u^2(L) \rangle$  varie en  $L^2$  pour une membrane passive près d'une paroi, ainsi que pour une membrane active libre. Cependant, dans le cas d'une membrane active près d'une paroi, cette amplitude varie en  $\ln(L/a)$ , où  $a$  est une longueur de coupure microscopique, ce qui traduit l'émergence d'une tension active qui tendrait à diminuer l'amplitude des fluctuations :

$$\Sigma = \frac{\Xi}{\left[ \frac{d^2\chi}{3w^2F_a} + \frac{F_a dw^2}{D} \right]} \quad (3.69)$$

Cette réduction des fluctuations serait en compétition avec les possibles effets d'amplification qui seraient présents dans une théorie qui prendrait en compte les non-linéarités du système. Une étude expérimentale de ce type de système est nécessaire pour déterminer l'effet dominant.

## CHAPITRE 4

---

### Mesures des propriétés physiques des membranes actives par micropipettes : Rappels

---

LES MEMBRANES CELLULAIRES sont le siège de l'activité de nombreuses protéines et complexes, qui assurent le transport d'ions à travers la membrane, et confèrent donc à celle-ci des propriétés hors équilibre. Nous avons vu dans le chapitre 3 différents modèles théoriques décrivant le comportement de membranes actives. Tous prévoient une augmentation des fluctuations des membranes due à l'activité protéique. Pour étudier l'effet de cette activité de manière expérimentale, il faut concevoir un système adapté. Les membranes cellulaires sont trop complexes pour pouvoir servir de modèle à cette étude. En effet, de par leur composition, la membrane d'une cellule contient des centaines (voir des milliers) de composants différents (lipides, et protéines). De plus, l'interaction avec le cytosquelette joue un rôle important et qui en rend la modélisation encore plus compliquée.

Nous allons présenter dans ce chapitre le système modèle qui a été développé à l'Institut Curie pour étudier les membranes actives. Nous décrirons ensuite le principe de l'expérience d'aspiration par micropipettes de vésicules géantes et les grandeurs physiques qu'elle permet de mesurer. Nous finirons par exposer les résultats des expériences conduites en utilisant cette technique, par J.B. Manneville sur des membranes contenant la Bactériorhodopsine (BR) [Manneville *et al.*, 1999], et par P. Girard sur des membranes contenant une ATPase- $Ca^{2+}$  [Girard *et al.*, 2004b].

## 4.1 Système modèle de membranes actives.

Pour étudier les membranes actives de manière expérimentale, il faut développer des systèmes modèles simples et de composition contrôlée. Les vésicules géantes sont parfaitement adaptées à une telle étude grâce à leur taille qui permet de les observer par microscopie optique, et de pouvoir les étudier par des méthodes de micromanipulation. Le point crucial reste l'incorporation des protéines transmembranaires dans les vésicules géantes en préservant leur conformation et leur activité.

Nous allons décrire, dans cette section les protocoles développés dans notre équipe pour obtenir des systèmes modèles de membranes actives. Nous allons présenter d'abord les protéines choisies pour jouer le rôle d'éléments actifs, puis l'approche développée et les résultats.

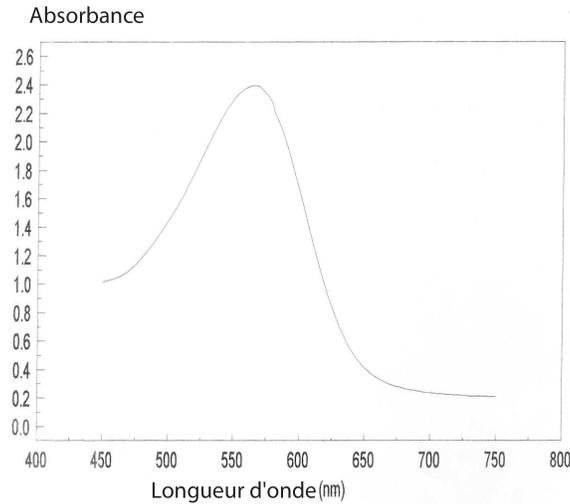
### 4.1.1 Les protéines transmembranaires utilisées

Le premier modèle théorique de membranes actives (le modèle Prost-Bruinsma [Prost et Bruinsma, 1996]) s'intéressait à l'influence de l'activité de canaux ioniques sur la physique des membranes. Cependant l'étude d'un tel système nécessite la purification et l'incorporation de ces protéines dans des membranes artificielles, ce qui n'a jamais été réalisé sur des vésicules géantes. De plus l'activation de ces canaux nécessite l'application de potentiels transmembranaires ou des contraintes mécaniques élevées, ce qui est difficile techniquement. Ces contraintes ont fait que les premières études expérimentales des membranes actives ont été réalisées sur les membranes contenant des pompes ioniques plutôt que des canaux. Les pompes utilisent généralement des sources d'énergie plus simple à fournir (lumière, ATP,... etc.), ce qui facilite, en les utilisant, la mise en place d'un système expérimental de membranes actives. Les premières expériences, conduites par J.B. Manneville, ont été faites en utilisant la bactériorhodopsine (BR), une pompe à protons photoactivable. A la suite de ces premiers travaux, P. Girard a étudié l'effet de l'activité de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Nous allons présenter dans la suite un descriptif des caractéristiques de ces deux protéines.

#### La bactériorhodopsine

##### Origine de la bactériorhodopsine :

La bactériorhodopsine est une pompe à protons exprimée à la surface de l'archéobactérie *Halobacterium Salinarium*. Cet organisme se développe dans des milieux à très haute concentration en sel (jusqu'à 4M [NaCl]) comme les marais salants [Madigan *et al.*, 1997]. La bactériorhodopsine s'organise en cristaux bidimensionnels hexagonaux, formant des membranes riches en BR qu'on appelle membrane pourpre à cause de sa couleur. Cette couleur vient des propriétés d'absorption de la protéine qui



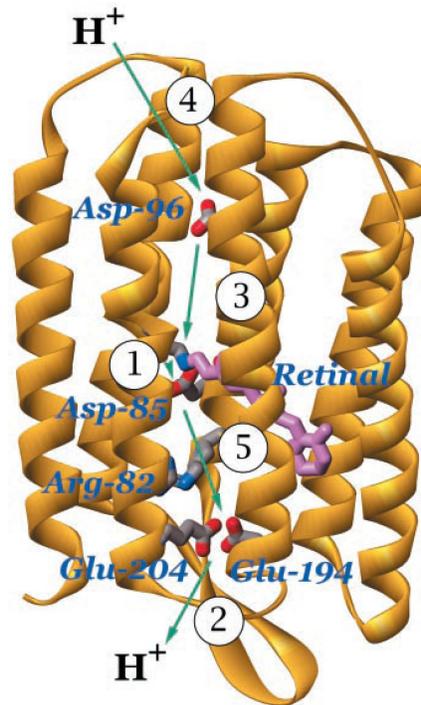
**Fig. 4.1.** Spectre d'absorption de la BR avec un maximum à 568 nm.

contient un chromophore (le rétinale) qui a un pic d'absorption à 568 nm (voir figure 4.1). En absorbant la lumière, le rétinale change de conformation, ce qui provoque toute une chaîne de translocations conduisant à la fin du cycle au transport net d'un proton du cytoplasme vers l'extérieur (figure 4.2). Le rôle de la BR *in vivo* est donc de transformer l'énergie lumineuse en un gradient électrochimique de protons à travers la membrane. Ce gradient est ensuite utilisé par un autre type de protéine (ATP synthase) pour transformer l'énergie emmagasinée dans ce gradient en un excès de molécules d'ATP. La BR est associée, dans la bactérie, à 3 autres types de protéines contenant le même rétinale :

- L'halorhodopsine : pompe des ions chlore  $Cl^-$  pour assurer l'électroneutralité et empêcher la formation de potentiel transmembranaire qui inhiberait l'activité de pompage.
- Les SensoryRhodopsine (SRI et SRII) : permettent à la bactérie de sentir les variations d'illumination et de se déplacer, grâce à ses flagelles, vers les zones les plus favorables à son activité.

#### Structure de la bactériorhodopsine :

La BR est une protéine transmembranaire d'un poids moléculaire de 26 kDa. C'est une séquence de 248 acide aminés qui s'organise dans une structure secondaire formée par 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires reliées entre elles par de courts domaines extramembranaires 4.2. Sa conformation dans la membrane fait qu'elle ne dépasse quasiment pas de la bicouche. Elle occupe une aire  $S_{BR} = 8,75 \text{ nm}^2$ , soit un disque de rayon  $R_{BR} = 1,7 \text{ nm}$ . A  $pH = 7$  elle a une densité de charge équivalente à 2 charges négatives.



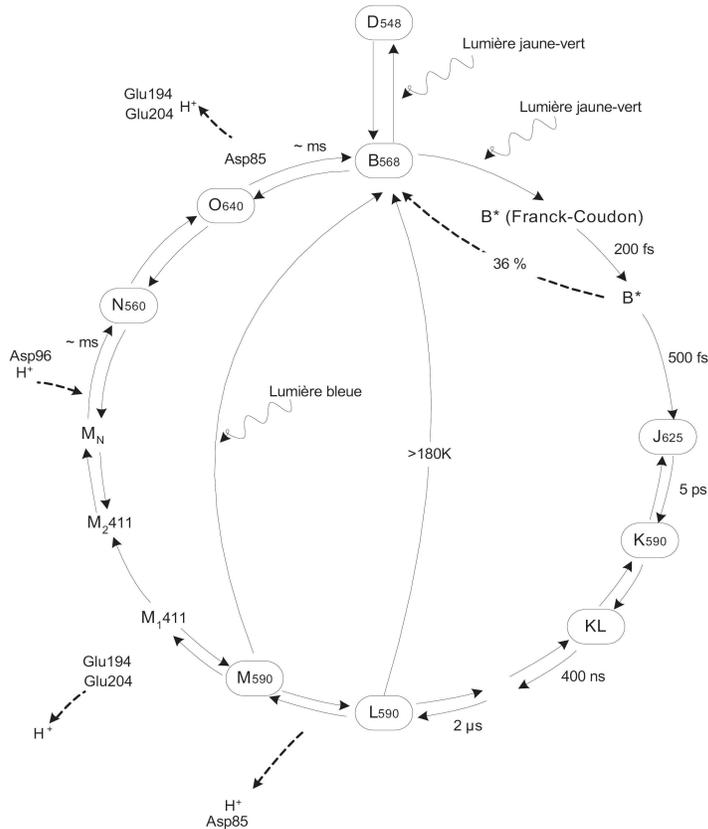
**Fig. 4.2.** Structure générale de la BR, le rétinol est indiqué en mauve. Les numéros correspondent aux étapes successives du cycle de pompage : 1- déprotonation de la base de Schiff, protonation de Asp85; 2- libération d'un proton à la surface du côté extracellulaire; 3- reprotonation de la base de Schiff, déprotonation de Asp96; 4- reprotonation de Asp96 depuis la surface du côté cytoplasmique; 5- déprotonation de Asp85, reprotonation du site de relargage du proton. (D'après [Luecke et al., 1999])

tives. Formant naturellement des cristaux dans sa membrane native, la BR fut la première protéine transmembranaire à être étudiée par des méthodes cristallographiques. Sa structure moléculaire a été déterminée par diffraction de rayon X ou par cristallographie électronique avec une résolution sub-nanométrique allant de 3,5 à 2,3 Å, dont un exemple est donné dans la figure 4.2 (revue [Subramaniam, 1999]).

#### Cycle de pompage :

Quand elle est maintenue dans l'obscurité, la BR est dans un état dit "dark-adapted". Dans cet état, la conformation du rétinol est répartie de façon équimolaire entre l'état 13-cis et all-trans. Le maximum d'absorption dans cette conformation est à 548 nm (état  $D_{548}$ ). Lorsque la BR est exposée à la lumière pendant quelques minutes, tous les rétinaux sont isomérisés dans la conformation all-trans. On dit que la protéine

passé à la configuration "light-adapted", pour laquelle le maximum d'absorption est à 568 nm (état  $B_{568}$ ) [Kouyama *et al.*, 1985]. Le spectre de la figure 4.1 correspond à cet état.

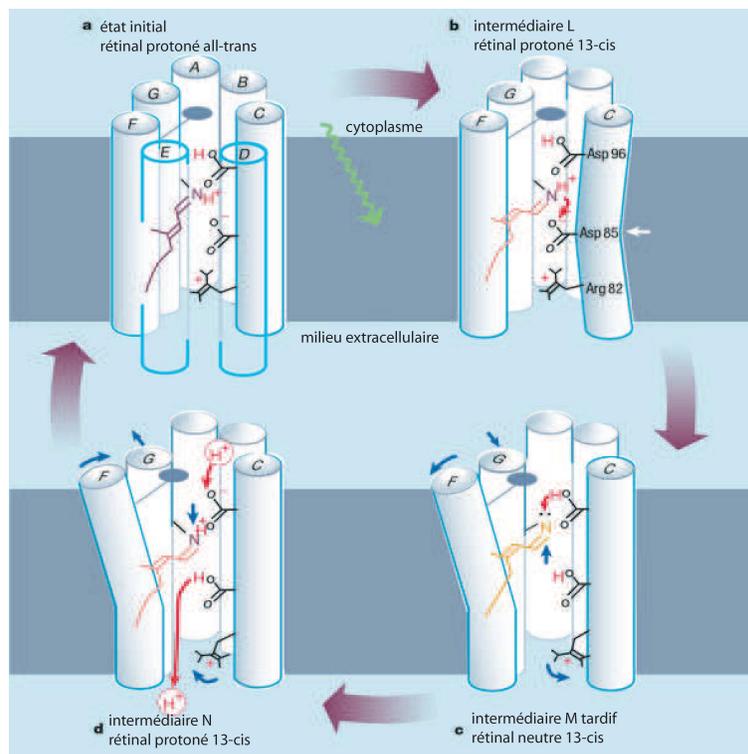


**Fig. 4.3.** Cycle de pompage de la BR indiquant les différents intermédiaires et les temps de transition. [Haupts *et al.*, 1999, Oesterhelt et Tittor, 1989, Birge, 1990, Luecke *et al.*, 1999]

Le rétinol contient la base de Schiff qui va être protonée ou déprotonée en fonction de son entourage moléculaire et donc des différentes conformations que prend la protéine au cours du cycle de pompage (figure 4.3). Ce cycle commence par l'absorption d'un photon dans la gamme de longueurs d'onde correspondante à l'absorption du rétinol (lumière actinique), qui fait passer le rétinol de l'état all-trans à 13-cis. Après un certain nombre d'intermédiaires (J, K, KL, L) [Polland *et al.*, 1986], la base de Schiff cède son proton au résidu Asp85. Se succèdent ensuite les transitions vers les états  $M$ ,  $M_1$  et  $M_2$ , durant lesquelles la base de Schiff va se réorienter du côté extracellulaire vers le côté cytoplasmique. Des changements de conformation, dont les plus importants sont les

basculements des hélices F et G, facilitent l'accès au rétinol du côté cytoplasmique et son interaction avec le résidu Asp96 qui reprotonne la base de Schiff lors de la transition à l'état N. Le basculement de l'hélice F constitue le mouvement de plus grande amplitude (3,5 Å) durant le cycle (figure 4.4). Lors de la transition vers l'état O le rétinol revient vers l'état all-trans, et le cycle est clos par le relâchement du proton par Asp85 du côté extracellulaire [Luecke *et al.*, 1999]. Ce cycle est résumé sur les figures 4.3 et 4.4.

Le cycle équivaut à relâcher un proton du côté extracellulaire et en absorber un du côté cytosolique. On a donc le transport d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, en utilisant la lumière "actinique" comme source d'énergie. Ce cycle dure typiquement 5 ms à pH=7 et à température ambiante. Ses étapes limitantes sont les transitions M →N et O →B, qui durent toutes les deux quelques millisecondes.



**Fig. 4.4.** Schéma du cycle de pompage de la BR mettant en évidence les changements de conformations des hélices  $\alpha$  de la protéine, notamment les hélices F et G. (D'après [Kühlbrand, 2000, Luecke et al., 1999])

### L'ATPase- $Ca^{2+}$

Les propriétés contractiles des cellules musculaires sont dues à l'activité de protéines motrices (les myosines) qui exercent des forces sur des fibres d'actine. L'activité de ce

complexe actine-myosine dépend de la concentration de calcium du milieu. Pour contrôler l'activité du muscle, il faut contrôler la concentration de calcium. Ce contrôle est assuré dans les cellules musculaires par le réticulum sarco(endo)plasmique (SR). 70% des protéines membranaires de cette organelle sont des pompes à calcium (ATPase- $Ca^{2+}$ ), appelée Serca 1a. Ces pompes transportent le calcium du cytoplasme dans le SR, de telle sorte que la concentration cytosolique en calcium est de l'ordre de  $0,1 \mu M$ . Quand la cellule reçoit le signal pour se contracter, sous la forme d'une dépolarisation du potentiel transmembranaire, des canaux ioniques s'ouvrent dans la membrane du SR libérant le calcium qui y est contenu. L'augmentation de la concentration de calcium (de  $0,1$  à  $10 \mu M$ ) déclenche la contraction du complexe actine-myosine. L'activité des pompes ATPase- $Ca^{2+}$  diminue ensuite la concentration de calcium et rétablit le gradient, permettant aux fibres musculaires de se relaxer en attente du signal suivant.

Cette protéine est également impliquée dans certaines maladies musculaires. En effet, certaines mutations de cette protéine sont responsables de maladies comme la myopathie autosomique récessive de Brody [Odermatt *et al.*, 1996], la maladie de Darier-White [Sakuntabhai *et al.*, 1999], et la maladie de Hailey-Hailey [Sudbrak *et al.*, 2000].

D'un point de vue structural, l'ATPase- $Ca^{2+}$  est une chaîne polypeptidique de 994 acides aminés d'un poids moléculaire de 110 kDa. Les structures de plusieurs conformations qu'elle adopte lors de son cycle de pompage ont été déterminées par cristallographie à une résolution de 2,6 et 3,1 Å, notamment celles des états E1 et E2 [Toyoshima *et al.*, 2000, Toyoshima et Nomura, 2002] (Figure 4.5).

On peut décomposer la structure de la protéine en trois parties :

- Une partie transmembranaire de 30 Å d'épaisseur, composée de 10 hélices  $\alpha$  (M1 à M10).
- Une tête cytosolique qui représente les deux-tiers (en taille) de la protéine, et constitue le siège catalytique.
- Une tige de 25 Å riche en hélices  $\alpha$  amphipatiques chargées négativement, qui relie la partie cytosolique à la partie transmembranaire.

Le cycle de pompage de l'ATPase- $Ca^{2+}$  peut être schématisé par un modèle à deux états E1 et E2 (figure 4.5). Quand la protéine est dans la conformation E1, elle fixe l'ATP (sites de fixation dans la partie cytosolique colorée en vert sur la figure 4.5) et deux ions calcium (sites de fixation dans la partie transmembranaire). L'hydrolyse de l'ATP et le largage de l'ADP induisent des changements de conformations qui conduisent à l'état E2. Dans cette nouvelle conformation, les sites de fixation du calcium se retrouvent en contact avec le lumen du SR, où le calcium est libéré. La déphosphorylation de la protéine induit des changements de conformations reconduisant vers l'état E1. Ce cycle de pompage s'accompagne du contre-transport de 2 à 3 protons en fonction des conditions de pH du milieu [Levy *et al.*, 1990, Forge *et al.*, 1995]. En comparant les conformations E1 et E2 on remarque que la partie cytosolique a des mouvements de grande amplitude au cours du cycle de pompage, de l'ordre de 40 Å (Figure 4.5). On s'attend donc à avoir un fort couplage hydrodynamique entre l'activité protéique et la



### Reconstitution de la BR dans l'éther

La BR est une protéine transmembranaire très résistante. Elle supporte notamment d'être solubilisée dans un l'éther. On a donc la possibilité de mélanger les lipides et les protéines dans une solution d'éther. La BR est extraite des bactéries sous la forme de membrane pourpre qui ne contient que cette protéine et des lipides avec un rapport de 10 lipides par protéine. La membrane pourpre est suspendue dans une solution aqueuse. Pour la solubiliser dans l'éther il faut en éliminer l'eau. Ceci est fait par lyophilisation. En congelant la solution dans de l'azote liquide et en la mettant sous vide, on sublime l'eau, et on ne garde que la membrane pourpre (poudre violette). On solubilise à ce stade la membrane pourpre avec des lipides de la composition souhaitée dans une solution d'éther à 1 mg/ml. On dépose un faible volume ( $\sim 10\mu\text{l}$ ) de cette solution sur des lames conductrices ITO à 4°C. L'éther s'évapore en laissant un film du mélange lipides-BR. En utilisant la méthode d'électroformation classique, avec une tension de 1,1 V et d'une fréquence de 10 à 12 Hz pendant 4 à 5 heures, avec ces lames (voir annexe A.1), on obtient des vésicules géantes contenant la BR. Ce protocole est décrit en détail en annexe A.3 p. 167.

Pour ces expériences de micropipettes sur les membranes actives, J.B. Manneville a utilisé ce protocole, mis en place par D. Levy, pour reconstituer la BR dans des bicouches EPC. Cependant, cette méthode a quelques désavantages :

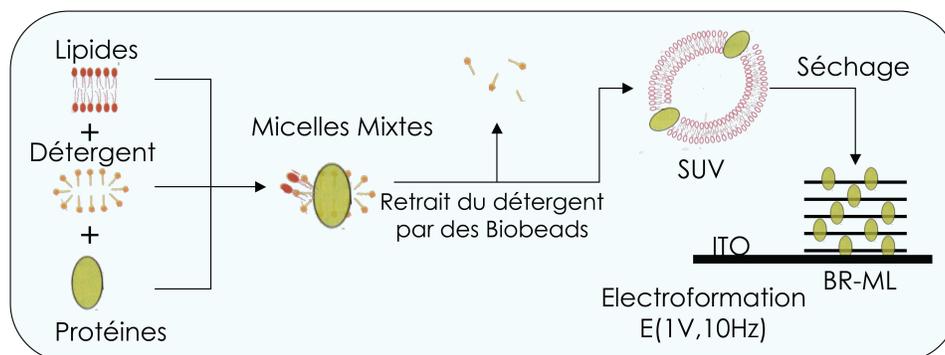
- Une distribution inhomogène de la BR dans la membrane, et J.B. Manneville avait montré la présence d'agrégats de protéines dans les membranes [Manneville, 1999].
- Manque de contrôle de la concentration finale de protéines dans une vésicule. (Très grande hétérogénéité de concentration d'une vésicule à l'autre)
- Impossibilité d'utiliser cette méthode pour d'autres protéines transmembranaires qui généralement ne résistent pas à l'éther.

### Reconstitution à l'aide de détergent

Dans le cadre de son travail de thèse, P. Girard s'est proposé d'étudier l'effet de l'activité de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  sur les propriétés physiques des membranes. On a vu dans la description des caractéristiques de cette protéine que sa partie cytosolique a des mouvements de grande amplitude lors de son cycle de pompage. Pour étudier l'influence de ces mouvements moléculaires sur les propriétés des membranes, il a fallu trouver un moyen d'incorporer l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  dans la membrane d'une vésicule géante.

La méthode de reconstitution passant par la solubilisation dans l'éther n'est pas utilisable avec cette protéine car l'éther la dénature. P. Girard et J. Pécréaux ont développé une méthode de fabrication de protéoliposomes géants en utilisant les méthodes de reconstitution des protéines en petits liposomes [Girard *et al.*, 2004a] (Schéma du protocole donné dans la figure 4.6).

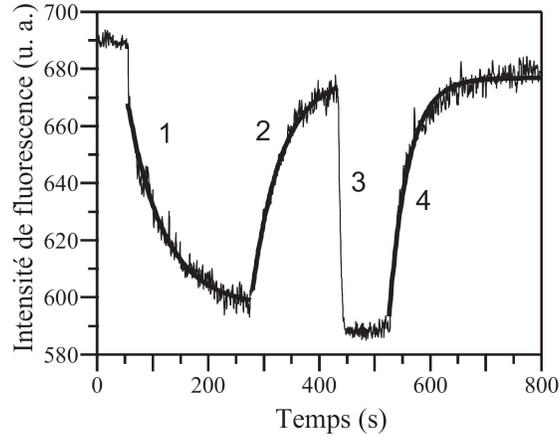
La première étape consiste à solubiliser la protéine dans une solution aqueuse à l'aide d'un détergent qui préserve la conformation et l'activité de la protéine (Triton X



**Fig. 4.6.** Schéma du protocole de reconstitution de protéines transmembranaires à l'aide d'un détergent à l'aide duquel sont solubilisés les lipides et les protéines. Le détergent est ensuite retiré grâce aux biobeads. Les lipides et les protéines se réorganisent en SUVs. Ces SUVs sont partiellement déshydratées sur une surface ITO à partir de laquelle on électroforme des vésicules géantes contenant les protéines.

100 pour la BR, et  $C_{12}E_8$  pour l'ATPase- $Ca^{2+}$ ). En ajoutant les lipides qui formeront la membrane (SOPC, EPC, ... etc.), solubilisés avec le même détergent, on obtient des micelles mixtes de lipides, protéines, et détergent. On ajoute alors des biobeads. Ce sont de petites billes poreuses en polystyrène de taille millimétrique, pour lesquelles le détergent a une grande affinité (SM2 Bio-Beads 25-50 mesh, BioRad, Hercule, CA). Après quelques heures d'agitation ( $\sim 4h$ ), on a quasiment plus de détergent en dehors des biobeads. Au fur et à mesure que la concentration de détergent diminue, les lipides et les protéines se réarrangent pour former au final de petits protéoliposomes ( $\sim 100 nm$ ). (Détails du protocole de reconstitution de la BR donné en annexe A.2).

On peut vérifier l'activité de la protéine à ce stade par des mesures de fluorescence en utilisant un spectrofluorimètre. Pour la BR par exemple, on utilise une sonde à pH, la 9-AminoAcridine [Cladera *et al.*, 1996]. La reconstitution de la BR à l'aide du Triton donne des liposomes où une majorité des protéines est orientée telles qu'elles pompent vers le milieu intérieur. En utilisant la 9-AminoAcridine, on voit une diminution de la fluorescence de cette molécule lors de l'activation de la BR par une lumière actinique. Ceci traduit une augmentation du pH du milieu extérieur due du l'activité de pompage de la BR qui transport des protons vers l'intérieur des vésicules. Ce transport induit aussi un potentiel transmembranaire qui réduit l'activité de pompage. L'addition de la valinomycine, une molécule qui facilite le passage d'ions  $K^+$  à travers la membrane, permet d'empêcher la formation de ce potentiel transmembranaire. Dans ces condition, la baisse de fluorescence due à l'activité de pompage devient plus abrupte (voir figure 4.7).



**Fig. 4.7.** Variation de l'intensité de fluorescence de la 9-Aminoacridine (9AA) ajoutée à une solution de LUVs contenant la BR. Le milieu extérieur contient 2 mM de KCl et 1 mM de MOPS ramené à  $pH = 6,8$  par du TRIS : 1- La solution est éclairée avec une lumière actinique. Baisse de la fluorescence. 2- La lumière actinique est éteinte. Remontée de la fluorescence. 3- Addition de la valinomycine puis éclairage avec une lumière actinique. Chute abrupte de la fluorescence. 4- Extinction de l'éclairage actinique. (Mesure réalisée par P. Girard)

La deuxième étape consiste à fabriquer des vésicules géantes à partir des petits protéoliposomes. Pour ce faire, on dépose des gouttes de la solution contenant ces petits protéoliposomes (typiquement  $2\mu l$  à  $0,8 mg/ml$ ) sur des lames conductrices (ITO). On laisse ces gouttes sécher partiellement dans une atmosphère de vapeur saturante d'une solution saturée de NaCl. Cette étape de séchage partiel est destinée à préserver l'activité des protéines. On finit par avoir un film de lipides et protéines à partir duquel on peut former des vésicules géantes par la méthode d'électroformation. Les protéoliposomes géants ainsi obtenus sont majoritairement unilamellaires, et les protéines sont toujours actives [Girard *et al.*, 2004a].

## 4.2 Principe de la technique de micropipettes

Une membrane libre fluctue à toutes les échelles de longueur. Cependant, les méthodes d'observation ont une résolution finie ( $\sim 300nm$  en microscopie optique). De ce fait, les fluctuations qui ont une longueur d'onde inférieure à cette limite de résolution (fluctuations suboptiques) sont invisibles. Une partie du froissage de la membrane n'étant pas détectée, l'aire observée est inférieure à l'aire réelle de la membrane. L'aire stockée dans ce froissage suboptique dépend des propriétés mécaniques de la membrane

et de la température. La technique d'aspiration par micropipettes permet de mesurer ces propriétés mécaniques en reliant la pression d'aspiration imposée à la vésicule à la quantité d'aire que cette contrainte permet de "défroisser".

En partant d'une vésicule aspirée avec un excès d'aire  $\alpha_0$  et une tension  $\sigma_0$ , lorsqu'on augmente l'aspiration de la vésicule, l'excès d'aire de la membrane diminue ( $\alpha < \alpha_0$ ). La variation de l'excès d'aire aspirée dans la pipette  $\Delta\alpha$  est liée à la tension de la membrane  $\sigma$  par la relation (Voir 2.2.2) :

$$\Delta\alpha \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right) + \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (4.1)$$

Pour mesurer les paramètres d'élasticité de la membrane  $\kappa$  et  $K_a$ , on doit mesurer pour plusieurs conditions d'aspiration, la tension imposée  $\sigma$  et l'excès d'aire emmagasinée dans la pipette  $\alpha$ .

### 4.2.1 Mesure de la tension

L'aspiration de la vésicule de diamètre  $D_v$  dans une micropipette de diamètre interne  $D_p$  permet d'imposer la tension de la membrane. On a formation d'une langue de membrane dans la micropipette de longueur  $L_p$ . Celle-ci peut-être reliée à la différence de pression entre la pipette et le milieu extérieur  $\Delta P = P_p - P_0$ . En appliquant la loi de Laplace on relie la différence de pression entre l'intérieur de la vésicule  $P_v$  et l'extérieur  $P_0$  d'une part, et entre l'intérieur de la vésicule et la pipette  $P_p$  d'autre part, à la tension de la membrane  $\sigma$  (voir figure 4.8) :

$$P_v - P_p = \frac{4\sigma}{D_p} \quad P_v - P_0 = \frac{4\sigma}{D_v} \quad (4.2)$$

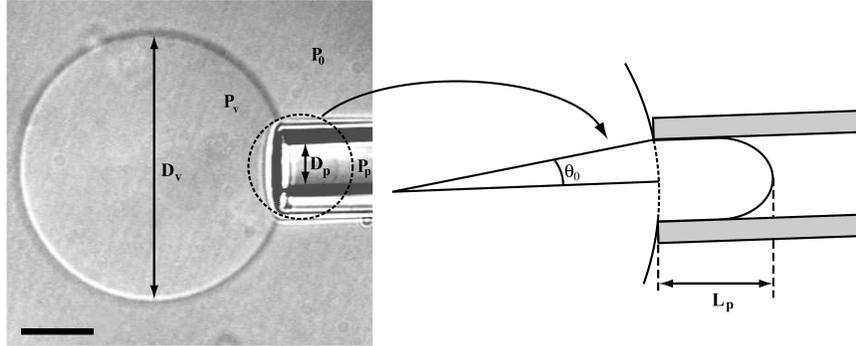
On trouve l'expression suivante pour la tension :

$$\sigma = \frac{D_p}{4(1 - D_p/D_v)} \Delta P \quad (4.3)$$

En pratique, la micropipette est reliée à un réservoir d'eau, dont la hauteur impose la pression hydrostatique  $P_p$ . On mesure la différence de pression  $\Delta P$  grâce à un transducteur qui compare la pression entre le réservoir relié à la micropipette et un réservoir référence (figure 4.9).

### 4.2.2 Mesure de l'excès d'aire

Une vésicule aspirée dans une micropipette peut être séparée en deux parties (figure 4.8) :



**Fig. 4.8.** Vésicule aspirée dans une micropipette, observée par DIC. La barre correspond à  $5\mu\text{m}$ . Le schéma de droite représente la langue aspirée dans la pipette. [Thèse P. Girard, 2004]

- La partie aspirée dans la pipette, qui a la forme d'un cylindre se terminant par une calotte sphérique. Son aire  $A_p$  et son volume  $V_p$  sont donnés par :

$$A_p = \pi \frac{D_p^2}{2} + \pi D_p \left( L_p - \frac{D_p}{2} \right) \quad (4.4)$$

$$V_p = \pi \frac{D_p^3}{12} + \pi \frac{D_p^2}{4} \left( L_p - \frac{D_p}{2} \right) \quad (4.5)$$

- Le reste de la vésicule qui forme une sphère à laquelle il manque une calotte sphérique d'angle  $\theta_0$ . Son aire  $A_v$  et volume  $V_v$  sont donnés par :

$$A_v = \pi \frac{D_v^2}{2} (1 + \cos(\theta_0)) \quad (4.6)$$

$$V_v = \pi \frac{D_v^3}{24} (2 + 3\cos(\theta_0) - \cos^3(\theta_0)) \quad (4.7)$$

avec  $\sin(\theta_0) = D_p/D_v$ .

Le volume de la vésicule étant constant, on a  $V_p + V_v = \pi D_v^3/6$ . La variation de l'aire entre l'état aspiré  $A = A_p + A_v$  et l'état libre  $A_0 = \pi D_v^2$  est donnée par la relation :

$$\frac{A - A_0}{A_0} \simeq \frac{(D_p/D_v)^2 - (D_p/D_v)^3}{D_p} L_p \quad (4.8)$$

En mesurant  $L_p$ ,  $D_v$ , et  $D_p$  par analyse d'image, on peut mesurer l'excès d'aire pour chaque condition d'aspiration et remonter ainsi à la variation de l'excès d'aire.

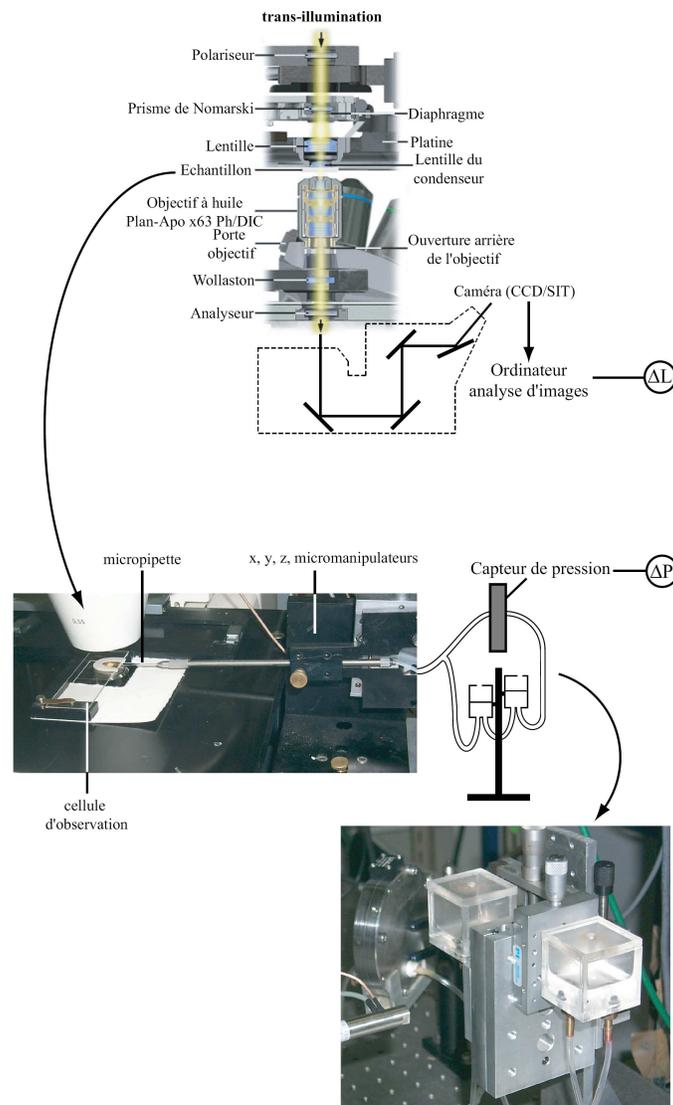


Fig. 4.9. Montage de l'expérience de micropipettes. [Girard, 2004]

### 4.2.3 Mesure des modules élastiques de la membrane

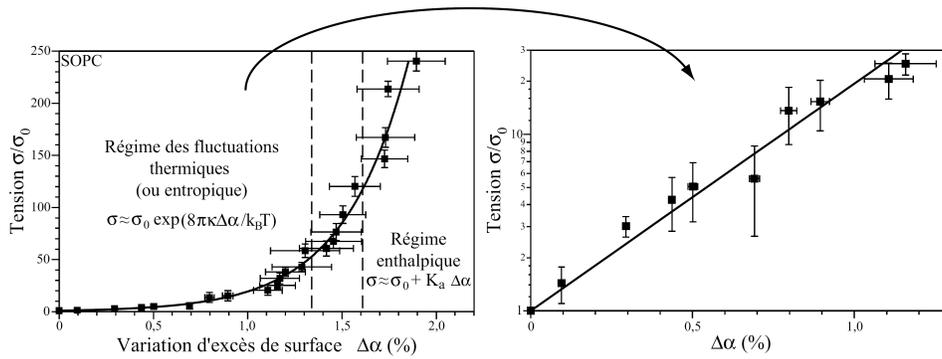
En aspirant une vésicule, de plus en plus fort dans une micropipette, on peut mesurer, la tension et l'excès d'aire. En traçant les résultats de ces mesures ( $\frac{\sigma}{\sigma_0}$  en fonction de  $\alpha_0 - \alpha$ ) on trouve une courbe comme celle de gauche de la figure 4.10. On distingue deux régimes :

- Un régime entropique où la tension augmente de façon exponentielle avec l'excès

d'aire. Ce régime correspond au défroissage de l'aire contenue dans les fluctuations suboptiques. Dans ce régime l'expression 4.1 devient :

$$\ln \left( \frac{\sigma}{\sigma_0} \right) \simeq \frac{8\pi\kappa}{k_B T} \Delta\alpha \quad (4.9)$$

- un régime enthalpique où la tension varie de façon linéaire avec l'excès d'aire. La pente de cette variation correspond au module de compressibilité  $K_a$ .



**Fig. 4.10.** Tension d'une membrane SOPC en fonction de la variation de l'excès d'aire  $\Delta\alpha$ . On peut distinguer deux régimes : entropique et enthalpique. En fittant la courbe de gauche par l'expression 4.1 on mesure  $\kappa = (11,9 \pm 0,2) \times k_B T$  et  $K_a = 313,0 \pm 45,1 \text{ mJ/m}^2$ . La courbe de droite représente le régime entropique que l'on peut fitter avec une droite en échelle semilogarithmique et mesurer ainsi  $\kappa$ . [Girard, 2004]

On peut donc se contenter de mesures dans le régime entropique pour mesurer le module de courbure  $\kappa$ . De plus, l'étude de ce régime permet de mesurer les effets liés aux fluctuations de la membrane, ce qui est particulièrement adapté au cas des membranes actives.

## 4.3 Résultats des mesures sur la BR

Les mesures sur les membranes actives contenant la BR ont été réalisées par J.B. Manneville [Manneville *et al.*, 2001].

### 4.3.1 Protocole

Les vésicules EPC contenant la BR ont été préparées selon de protocole de reconstitution par solubilisation dans l'éther (Protocole annexe A.3). Les vésicules ont été

électroformées dans une solution de 50 mM de sucrose contenant 1 mM d'azide de sodium. Elle ont été ensuite transférées dans une solution équimolaire de glucose contenant également 1 mM d'azide de sodium. La protéine était marquée avec la molécule fluorescente FITC.

Les vésicules étaient observées en DIC avec un microscope inversé Axiovert 135, Zeiss. Les mesures sont faites dans deux conditions d'illumination :

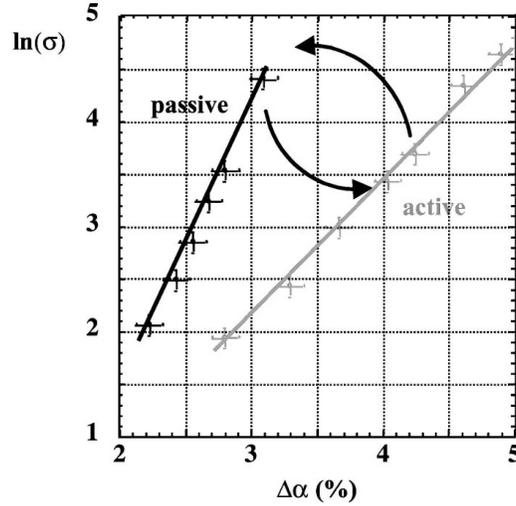
- Illumination à travers un filtre passe haut (en longueur d'onde), avec une longueur d'onde de coupure de 650 nm (donc rouge). Cette illumination est non-actinique (c.à.d elle n'active pas le pompage de la protéine).
- Illumination à travers un filtre passe haut (en longueur d'onde), avec une longueur d'onde de coupure de 500 nm (donc jaune). Cette illumination est actinique (c.à.d elle active le pompage de la protéine).

La pression d'aspiration appliquée à la vésicule a été mesurée par un transducteur Validyne SEI-3D. L'excès d'aire a été mesuré par observation en vidéomicroscopie (DIC).

### 4.3.2 Mesures de micropipettes : résultats

L'objectif du travail de thèse de J.B. Manneville était de mesurer les propriétés physiques des membranes actives. C'était le premier projet expérimental dans ce domaine [Manneville, 1999]. Il a étudié d'abord les modifications dues à l'incorporation de la protéine dans la membrane. Il a montré que les mesures par aspiration dans une micropipette ne montrent aucune différence entre le module de courbure  $\kappa_p$  de la membrane à l'équilibre contenant la BR et celui des membranes EPC pures  $\kappa = \kappa_p = 9,9 \pm 0,3 k_B T$ .

Il a aussi conduit des expériences de micropipette sur des membranes contenant la BR dans deux conditions d'illuminations différentes : non-actinique qui correspond au cas d'une membrane à l'équilibre, et actinique qui correspond au cas d'une membrane active. Le résultat de ces deux mesures sur une même vésicule est donné dans la figure 4.11. On remarque que, pour une membrane active, la tension augmente toujours de façon exponentielle en fonction de la variation de l'excès d'aire. La courbe est linéaire en échelle semi-logarithmique. On introduit  $T_{eff}$  pour la décrire de façon similaire au cas passif :  $\ln(\frac{\sigma}{\sigma_0}) = \frac{8\pi\kappa}{k_B T_{eff}} \Delta\alpha$ . (On aurait pu introduire un  $\kappa_{eff}$ . Le choix de  $T_{eff}$  correspond à la façon de décrire les systèmes hors équilibre en physique statistique). La pente dans le cas actif est clairement plus faible que celle de la courbe passive  $T_{eff} \simeq 2 \times T$ . Ceci suggère une augmentation active de l'amplitude des fluctuations de la membrane. J.B. Manneville avait, de plus, confirmé que cette amplification était due à des phénomènes actifs, car elle était affectée par la viscosité du milieu extérieur, ce qui ne serait pas le cas pour des membranes à l'équilibre.



**Fig. 4.11.** *Mesure de la tension membranaire en fonction de la variation de l'excès d'aire  $\Delta\alpha$ , en échelle semilogarithmique, pour une même vésicule dans des conditions d'illumination non-actiniques (cas passif en noir) et actiniques (cas actif en gris clair). [Manneville et al., 2001]*

### 4.3.3 Interprétation des résultats

Pour interpréter ces résultats, J.B. Manneville et ses collaborateurs s'étaient appuyé sur le modèle RTP avec dipôle hydrodynamique. Effectivement, ce modèle est particulièrement adapté au cas des membranes avec des pompes protéiques, avec une faible perméation. Il avait d'ailleurs été développé pour analyser ces résultats. Ce modèle, tout comme celui de [Leibler et Andelman, 1987] auparavant, prévoit une réduction du module de courbure à cause du couplage entre la densité de protéines et la courbure de la membrane pris en compte par le paramètre  $\Xi$  :

$$\kappa_p = \kappa - \frac{\Xi^2}{\chi}$$

Le module de courbure est mesuré à une précision de  $\pm k_B T$ . Comme  $\kappa_p = \kappa$ , ceci impose que  $\frac{\Xi^2}{\chi} < k_B T$ . Si on estime  $\chi \simeq \frac{k_B T}{\phi_0}$  par sa valeur pour un gaz parfait de protéines de densité  $\phi_0 = 10^{16} m^{-2}$ , on trouve que  $\Xi < 4 \cdot 10^{-29} J \cdot m$ . En prenant en compte des effets de flexoélectricité, les auteurs de [Manneville *et al.*, 2001] estiment  $\Xi \simeq w k_B T \simeq 2 \cdot 10^{-29} J \cdot m$ .

Pour le cas d'une membrane active, le modèle RTP donne une expression pour la température effective (voir chapitre 3 eq. 3.46 p. 60). En estimant :  $|\mathcal{P}_a| \simeq \kappa$ ,  $|\Xi| \simeq w k_B T$ , et  $\chi \simeq \frac{k_B T}{\phi_0} \simeq k_B T l^2$ , avec  $w$  épaisseur de la membrane, et  $l$  distance entre

protéines qui vérifient  $0,3 \leq \frac{w}{l} \leq 1$  et  $\kappa \simeq 10k_B T$  on trouve que

$$1,7 \leq \frac{T_{eff}}{T} \leq 2,3$$

ce qui correspond aux mesures expérimentales. On en conclut que le modèle RTP avec dipôle hydrodynamique décrit correctement les expériences de micropipettes sur les membranes contenant de la BR.

## 4.4 Résultats de la mesure sur l'ATPase- $Ca^{2+}$

Les mesures sur les membranes actives contenant l'ATPase- $Ca^{2+}$  ont été réalisées par P. Girard [Girard *et al.*, 2004b].

### 4.4.1 Protocole.

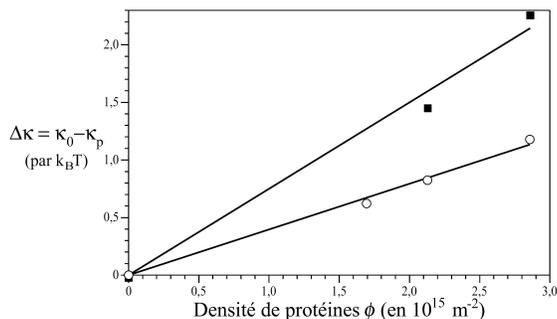
Les vésicules utilisées pour ces expériences de micropipettes ont été préparées selon le protocole de reconstitution en détergent ( $C_{12}E_8$ , Protocole similaire à celui présenté en annexe A.2). Les membranes étaient composées soit de SOPC soit d'un mélange EPC :EPA avec un rapport molaire 9 :1, et de différentes concentrations en ATPase- $Ca^{2+}$  Serca1a. L'étape d'électroformation a été conduite dans une solution de sucrose à 100 mM, contenant 1mM Mops-Tris à pH 7.0 et 1 mM  $MgCl_2$ . Les vésicules sont ensuite transférées dans une chambre d'observation remplie avec une solution équimolaire de glucose contenant 5 mM de Mops-Tris pH 7.0, 5 mM  $MgCl_2$ , et 0,5 mM  $CaCl_2$ .

Les vésicules ont été observées en DIC à l'aide d'un microscope inversé Zeiss, Axiovert 135 équipé d'un objectif à immersion Plan-Apochromat 63× d'une ouverture numérique N.A = 1,4. Les images ont été obtenues grâce à une camera CCD Pulnix TM-6EX. La pression d'aspiration appliquée à la vésicule est mesurée à l'aide d'un transducteur Validyne, SEI-3D.

### 4.4.2 Résultats des mesures par micromanipulation et leur interprétation

P. Girard a d'abord étudié l'effet de l'incorporation de la protéine sur le module de courbure  $\kappa_p$  de la membrane. Il a mesuré le module de courbure de membranes SOPC ou EPC-EPA 9 :1 contenant différentes concentrations d'ATPase- $Ca^{2+}$ . La différence entre ce module de courbure  $\kappa_p$  et celui de la membrane sans protéines  $\kappa_0$  est représentée dans la figure 4.12. On remarque que, comme prévu par différents modèles théoriques  $\kappa_p = \kappa - \frac{\phi_0 \Xi^2}{k_B T}$  [Leibler, Andelmann, RTP], l'introduction de la protéine dans la membrane réduit le module de courbure de celle-ci. En utilisant un fit linéaire des résultats de la figure 4.12, on peut estimer la valeur du paramètre de couplage de la densité de

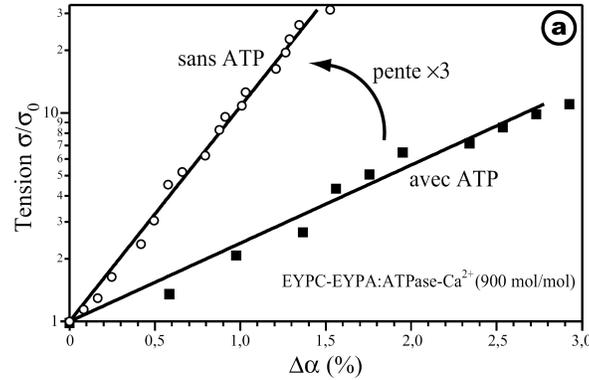
protéines à la courbure de la membrane  $\Xi$ , qui vaut  $\Xi = 1,1 \pm 0,3 \times 10^{-28} J.m$  pour les membranes SOPC et  $\Xi = 0,8 \pm 0,2 \times 10^{-28} J.m$  pour les membranes EPC :EPA.



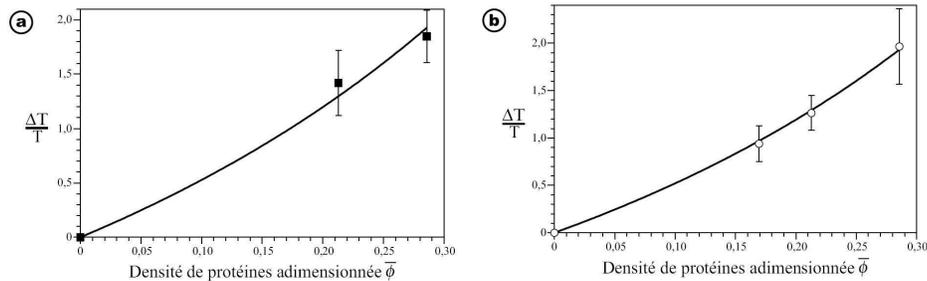
**Fig. 4.12.** Variation du module de courbure  $\Delta\kappa = \kappa_0 - \kappa_p$  en fonction de la densité de protéines *Serca1a* incorporées. [Girard, 2004]

P. Girard a aussi fait des mesures comparatives sur des membranes contenant l'ATPase- $Ca^{2+}$  entre les cas où les protéines sont actives ou inactives. La mesure correspondant au cas passif est faite en absence d'ATP, tandis que la mesure correspondant au cas actif est faite en présence de 1 mM d'ATP dans la solution de glucose formant le milieu extérieur de la vésicule. Dans ce cas seules les protéines qui ont leur site de fixation de l'ATP orienté du côté externe sont actives. L'incorporation des protéines étant symétrique, ceci correspond à la moitié des protéines contenues dans la membrane. La figure 4.13 représente l'évolution de la tension membranaire en fonction de la variation de l'excès d'aire aspirée dans la pipette en présence et absence d'ATP. On remarque que l'activité protéique réduit sensiblement la pente de la courbe en échelle semilogarithmique, et de façon encore plus importante que pour la BR. Ce résultat peut s'interpréter comme précédemment en introduisant une température effective  $T_{eff} \simeq 3 \times T$  pour une densité de protéine  $\phi_0 = 2,9.10^{15} m^{-2}$ . Ceci traduit également une amplification active des fluctuations.

Contrairement au cas de la BR où la densité de protéines incorporées ne semblait pas influencer ni le module de courbure de la membrane, ni les effets actifs, la densité d'ATPase- $Ca^{2+}$  modifie l'amplitude de ces effets. La figure 4.14 montre l'évolution de la variation relative de la température effective par rapport à la température thermodynamique  $\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_{eff} - T}{T}$  en fonction de la densité de protéines incorporées dans des membranes SOPC (carrés noirs) et EPC :EPA (ronds clairs). On voit que la valeur de la température effective augmente avec la densité de protéines incorporées. Un fit linéaire de cette augmentation en utilisant l'expression de la température effective donnée par la théorie RTP avec dipôle hydrodynamique permet de mesurer la valeur de ce dipôle hydrodynamique. P. Girard avait ainsi obtenue  $\mathcal{P}_a = 9,0 \pm 1,0 \times k_B T$  pour SOPC, et  $\mathcal{P}_a = 8,3 \pm 0,7 \times k_B T$  pour la composition EPC :EPA 9 :1.



**Fig. 4.13.** Mesure de la tension membranaire en fonction de la variation de l'excès d'aire, en échelle semilogarithmique en absence d'ATP (ronds) et en présence de 1 mM d'ATP dans le milieu extérieur (carrés noirs). [Girard, 2004]



**Fig. 4.14.** Variation relative de la température effective en fonction de la densité adimensionnée  $\bar{\phi} = w^2\phi$  d'ATPase- $Ca^{2+}$  reconstituée dans des vésicules SOPC (a), et des vésicules EPC :EPA 9 :1 (b). Les courbes représentent le fit des points expérimentaux par l'expression de la température effective issue de la théorie RTP avec dipôle hydrodynamique. Ce fit donne :  $\mathcal{P}_a = 9,0 \pm 1,0 \times k_B T$  pour SOPC, et  $\mathcal{P}_a = 8,3 \pm 0,7 \times k_B T$  pour la composition EPC :EPA. [Girard, 2004]

## 4.5 Conclusion

Les expériences d'aspiration par micropipette ont permis de mettre en évidence l'existence d'une amplification des fluctuations due à l'activité des pompes protéiques. Elles ont permis de quantifier cette amplification par la mesure d'une température effective qui est de l'ordre de  $2 \times T$  pour la BR, et de  $3 \times T$  pour l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Ces

mesures sont cohérentes avec les prédictions du modèle RTP avec dipôle hydrodynamique. Ce dipôle a pu être mesuré pour l'ATPase- $Ca^{2+}$  et est de l'ordre  $\mathcal{P}_a = 9k_B T$ . Son estimation pour la BR donne une valeur du même ordre de grandeur.

La technique de micropipette permet de révéler des effets hors-équilibre dans les membranes actives. Cependant, elle ne permet pas de déterminer à quelles échelles de longueur ces amplifications sont dominantes. En effet, comme on a vu dans le chapitre 3, plusieurs modèles théoriques prévoient l'existence d'une température effective, en prenant des couplages différents. Pour comparer les prédictions de ces différents modèles, il est nécessaire de quantifier ces amplifications en fonction de la longueur d'onde. Ceci nécessite la mesure du spectre de fluctuations des membranes actives. C'était l'objectif de mon travail de thèse.



---

### Spectroscopie de fluctuations de vésicules géantes passives

---

**A** PARTIR DE LA DÉTECTION DE CONTOURS d'une vésicule géante, on peut mesurer le spectre de fluctuations de celle-ci, c'est à dire la variation de l'amplitude des fluctuations en fonction du vecteur d'onde. Ce spectre permet de mesurer les paramètres physiques qui caractérisent une membrane passive, sa tension et son module de courbure, de façon non-intrusive. Pour cela il faut comparer ces mesures aux prédictions des modèles théoriques.

Il faut trois étapes pour pouvoir mesurer les propriétés d'une membrane par l'analyse de contours d'une vésicule :

- Formation de l'image du contour de la vésicule fluctuante, puis la détection d'un ensemble de contours statistiquement représentatif de la dynamique des fluctuations.
- Mesure de l'amplitude moyenne des différents modes de déformation du contour par transformée de Fourier de la série de contours détectés.
- Analyse du spectre de fluctuations pour mesurer les caractéristiques physiques de la membrane.

Nous allons présenter dans cette section le principe de cette méthode de mesure, implémentée dans notre laboratoire par J. Pécéréaux [Pécéréaux *et al.*, 2004, Pécéréaux, 2004], ainsi que les mesures qu'il a effectuées sur des vésicules purement lipidiques. Nous finirons en décrivant les résultats que nous avons obtenus en utilisant ce système sur des membranes passives.

## 5.1 Imagerie et détection de contours

La première étape de la mesure consiste à former l'image du contour de la vésicule fluctuante et le détecter. Nous allons présenter dans la suite la méthode d'imagerie par contraste de phase et les propriétés de l'image qui permettent de déterminer la position de la membrane. Puis nous décrirons la procédure de détection de contour sur une image, pour finir par la description du processus d'acquisition en temps réel.

### 5.1.1 Détection de la position de la membrane

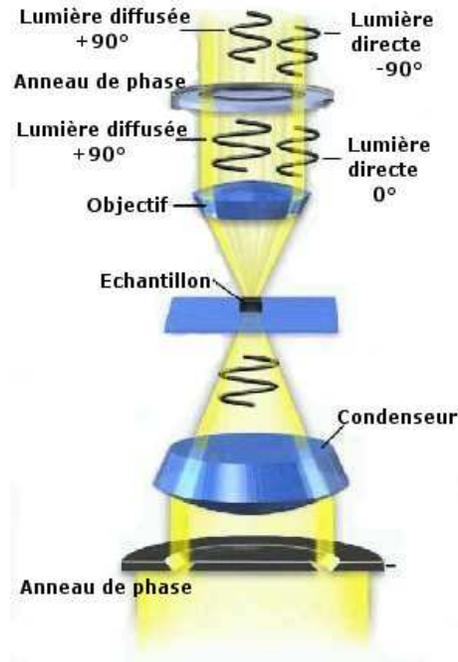
#### L'image d'un objet de phase

La formation de l'image d'un objet en transmission se fait par l'interférence de la partie de la lumière incidente diffractée par cet objet avec le reste de la lumière incidente qui n'a pas interagi avec lui. L'interaction de la lumière avec les objets dits "d'amplitude" introduit un déphasage de  $180^\circ$ . Quand cette lumière interfère avec la lumière incidente non diffractée, on a des interférences destructives qui donnent le contraste de l'image. C'est le principe de base de la microscopie en fond clair. Cependant, les membranes lipidiques ne sont pas des objets d'amplitude mais des objets "de phase". Ceci veut dire que la lumière diffractée par elles n'est pas déphasée de  $180^\circ$  mais de  $90^\circ$  seulement. Ces objets ne sont pas visibles par microscopie en fond clair. Pour pouvoir les observer il faut trouver un moyen de créer des interférences destructives pour donner du contraste à l'image. Une méthode, pour faire cela, est la microscopie à contraste de phase.

#### Microscopie à contraste de phase

La technique d'imagerie par contraste de phase a été mise au point par Frits Zernike en 1934. Cette méthode d'imagerie permet d'avoir des images très contrastées d'objets de phase. De ce fait, elle a rendu possible l'observation des organismes biologiques (qui sont, pour la plupart, des objets de phase) sans avoir recours à des procédés de fixation et de marquage qui ne permettaient pas d'observer des cellules vivantes. Cette technique a révolutionné la biologie cellulaire en permettant d'étudier les cellules vivantes directement dans leur milieu de culture, ce qui a valu à son inventeur le prix Nobel de physique de l'année 1953.

Pour obtenir des images contrastées d'objets de phase, Zernike a développé une astuce technique qui permet d'augmenter le déphasage entre la lumière diffractée par l'échantillon et le reste de la lumière incidente et de le faire passer de  $90^\circ$  à  $180^\circ$ . Le principe de cette méthode est décrit dans le schéma de la figure 5.1. L'illumination est faite par un cône creux de lumière. La lumière qui n'interagit pas avec l'échantillon suit un trajet spécifique (qui passe par le bord des optiques), tandis que la lumière diffractée se propage dans toutes les directions. En mettant un "anneau de phase" sur le trajet du cône de lumière non diffractée on peut modifier sa phase. En avançant la phase



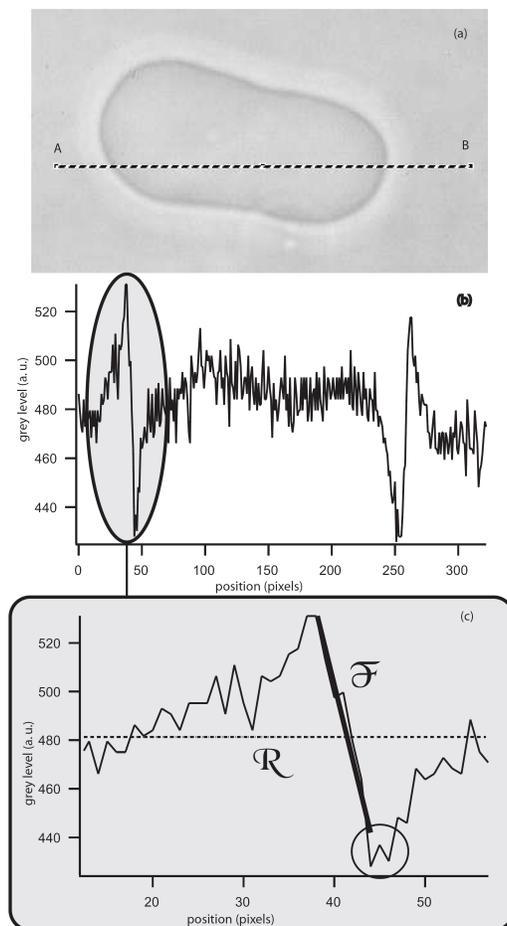
**Fig. 5.1.** *Principe de l'imagerie par contraste de phase* (<http://www.irvingcrowley.com/cls/phase.jpg>).

du cône de lumière de  $90^\circ$ , son déphasage par rapport à la lumière diffusée devient de  $180^\circ$ . On a ainsi des interférences destructives qui donnent le contraste à l'image. Il est aussi possible de retarder la phase du cône de lumière de  $90^\circ$ , et de créer ainsi des interférences constructives.

### La position de la membrane en contraste de phase

La première étape dans la détection du contour d'une vésicule est la détermination de la position de la membrane. En effet, la bicouche lipidique a une épaisseur de 5 nm environ, elle est donc largement en-dessous de la résolution des techniques optiques. Pour pouvoir la visualiser, on fait en sorte que les milieux de part et d'autre de la membrane aient des indices optiques différents. On peut dans ces conditions utiliser le profil d'intensité produit par ce saut de l'indice optique à cette interface pour repérer la position de la membrane (figure 5.2).

On remarque particulièrement la partie linéaire à forte pente  $\mathcal{F}$ . Cette propriété permet de déterminer la position de la membrane à l'endroit où cette partie linéaire coupe le niveau d'intensité moyen  $\mathcal{R}$ . Cette méthode permet d'atteindre une résolution de l'ordre du dixième du pixel. C'est celle qui est utilisée dans l'algorithme de Jacques



**Fig. 5.2.** (a) : Image d'une vésicule géante en contraste de phase. (b) : profil d'intensité lumineuse le long de la ligne AB sur l'image (a). (c) : zoom sur la partie grisée du profil (b) qui correspond à la position de la membrane. La partie linéaire à forte pente est fittée par une droite  $\mathcal{F}$ . La ligne horizontale en pointillés  $\mathcal{R}$  correspond au niveau d'intensité moyen. La position de la membrane est déterminée par l'intersection de ces deux droites  $\mathcal{F}$  et  $\mathcal{R}$ . [Pécraux et al., 2004]

Pécraux [Pécraux, 2004]. Une autre possibilité est de faire correspondre le minimum d'intensité à la position de la membrane (entouré par un rond dans la figure 5.2). Cette procédure ne donne pas une détermination consistante dans le cas où le minimum est mal défini, et peut donc être source de bruit additionnel.

### 5.1.2 Détection du contour sur une image

Pour détecter le contour d'une vésicule sur une image en contraste de phase, il faut déterminer la position de la membrane point par point de manière à avoir au final un contour fermé. Il faut tout d'abord détecter un premier point appartenant à la membrane, puis de proche en proche les points suivants jusqu'à ce qu'on revienne au point de départ. Nous allons décrire dans ce qui suit la manière dont le programme, réalisé par J. Pécréaux, reconnaît le contour d'une vésicule.

#### Détection du premier pixel

L'utilisateur définit d'abord le champ sur l'image où se trouve la vésicule. Le programme détecte le premier point de la membrane en traçant une ligne horizontale au milieu de la zone définie. En analysant l'intensité le long de cette ligne, le programme tente de fitter le profil, en chaque point, sur un intervalle de 15 pixels (7 avant le point testé, et 7 après) par une droite et en mesure la pente. Ce processus est appliqué à tous les points de la ligne. Le point qui a la plus grande valeur de pente est considéré comme le premier point du contour. Ceci est fait pour la première image (ou à la suite d'une image où le contour n'a pas été détecté). Pour les images suivantes, le programme utilise comme point de départ le dernier point détecté sur l'image précédente.

Une fois ce premier point (pixel) déterminé, le programme mesure la position de la membrane avec une précision qui est en dessous du pixel (dixième du pixel dans notre cas). Ce point ne correspond donc pas à un pixel. Il faut détecter, après, le pixel suivant à utiliser pour mesurer la position suivante de la membrane. Nous allons d'abord expliquer comment est mesurée la position de la membrane, pour ensuite décrire la méthode du choix du pixel suivant.

#### Mesure de la position de la membrane

Le programme trace à partir du  $i^{\text{ème}}$  pixel détecté  $(x_i, y_i)$  4 lignes (horizontale, verticale, et 2 diagonales) le long desquelles il va chercher un profil correspondant à la position de la membrane. Pour illustrer cette étape prenons l'exemple de l'analyse selon la ligne horizontale ( $Ox$ ) qui passe par  $(x_i, y_i \pm 1)$ . Le choix du signe  $\pm$  dépend des points détectés précédemment et est choisi de telle sorte à éviter de revenir en arrière. Le programme approche le profil d'intensité selon cette ligne par une droite sur l'intervalle  $[(x_i - 5, y_i \pm 1), (x_i + 5, y_i \pm 1)]$  (droite  $\mathcal{F}$  de la figure 5.2). Le programme calcule aussi le niveau d'intensité moyen autour de ce point sur l'intervalle  $[(x_i - 15, y_i \pm 1), (x_i + 15, y_i \pm 1)]$  (droite  $\mathcal{R}$  de la figure 5.2). On détermine la position de la membrane dans la direction ( $Ox$ ) par l'intersection de  $\mathcal{F}$  et  $\mathcal{R}$  que l'on note  $(\bar{x}_i, y_i \pm 1)$ . On rappelle que ce point ne correspond pas à un pixel. On note aussi  $S_i^x$  la pente de la droite  $\mathcal{F}$ . En appliquant la même procédure selon l'axe vertical ( $Oy$ ), et les deux diagonales ( $Ov$ ) et ( $Ow$ ), on trouve au total 4 estimations de la position de la membrane  $(\bar{x}_i, \bar{y}_i, \bar{v}_i, \bar{w}_i)$ , et

quatre valeurs de pentes  $S_i^x, S_i^y, S_i^v, S_i^w$ . La position de la membrane est calculée comme le barycentre de ces 4 estimations pondérées par les valeurs des pentes correspondantes.

$$\begin{aligned} \tilde{x}_{i+1} = & [S_i^x(x_i \pm 1) + S_i^y(\bar{x}_i) + S_i^v(\pm\sqrt{2}/2 - \bar{w}_i/\sqrt{2}) \\ & + S_i^w(\mp\sqrt{2}/2 + \bar{v}_i/\sqrt{2})] / (S_i^x + S_i^y + S_i^v + S_i^w) \end{aligned} \quad (5.1)$$

$$\begin{aligned} \tilde{y}_{i+1} = & [S_i^x(\bar{y}_i) + S_i^y(y_i \pm 1) + S_i^v(\pm\sqrt{2}/2 + \bar{w}_i/\sqrt{2}) \\ & + S_i^w(\pm\sqrt{2}/2 + \bar{v}_i/\sqrt{2})] / (S_i^x + S_i^y + S_i^v + S_i^w) \end{aligned} \quad (5.2)$$

Le point ainsi calculé ne correspond pas à un pixel sur l'image. Il faut donc trouver des critères pour choisir le point suivant pour reprendre l'analyse, et avoir un processus qui progresse le long du contour.

### Choix du pixel suivant

Pour choisir le nouveau pixel  $(x_{i+1}, y_{i+1})$ , le programme essaye successivement 4 méthode d'estimation :

- Première méthode : Arrondir la valeur de  $(\tilde{x}_{i+1}, \tilde{y}_{i+1})$  à l'entier le plus proche. C'est la manière la plus naturelle, mais, dans un certain nombre de cas, elle redonne le pixel de départ  $(x_i, y_i)$ , ce qui bloque la progression de la détection.
- Deuxième méthode : Dans la cas où une des pentes  $S_i^x, S_i^y, S_i^v, S_i^w$  est nettement plus élevée que les autres, on choisit d'avancer d'un pixel perpendiculairement à la direction correspondante à cette pente. Le sens du mouvement est choisi, en se référant à la dizaine de points détectés précédemment, de sorte à éviter de rebrousser chemin.
- Troisième méthode : On calcule le vecteur normalisé  $\vec{d}$  entre les points  $(\tilde{x}_{i-10}, \tilde{y}_{i-10})$  et  $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ . On compare ensuite sa direction avec celles des vecteurs unitaires des 4 directions  $(Ox), (Oy), (Ov), (Ow)$ , et leurs opposés. On choisit parmi ces vecteurs celui qui fait un angle inférieur à  $22,5^\circ$  avec  $\vec{d}$ , et on fait un pas dans sa direction en partant du point  $(x_i, y_i)$ .
- Quatrième méthode : On utilise les coordonnées  $(x, y)$  du vecteur reliant  $(\tilde{x}_{i-10}, \tilde{y}_{i-10})$  à  $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ . Si  $|x|$  est plus grand qu'un certain seuil, on fait un pas selon  $(Ox)$  dans le sens correspondant au signe de  $x$ , et de même pour l'ordonnée  $y$ .

Le point ainsi déterminé par chaque méthode est testé par trois différentes méthodes (cf. thèse J. Pécréaux) pour vérifier que le contour ne revient pas sur ces pas. Si un des tests échoue, le programme passe à la méthode suivante. Si ces quatre méthodes échouent, le programme reprend la méthode de détection du premier pixel (expliquée plus haut) sur l'image suivante.

### Fin de la reconnaissance d'un contour

La détection du contour sur une image se termine pour une des trois raisons suivantes :

- Le programme n'a pas réussi à déterminer le pixel suivant pour continuer la détection. Le contour est dans ce cas abandonné.
- Le programme a réussi à reconnaître un contour clos. Le contour est dans ce cas enregistré.
- Le nombre maximum de points détecté a été atteint. Le contour est dans ce cas abandonné.

Pour déterminer si un contour est clos, le programme compare la position du pixel déterminé avec celle du pixel indexé par  $m$  (où  $m$  vaut typiquement 10). Si le nouveau point détecté est à la même position que  $(x_m, y_m)$  à un nombre ajustable de pixels près (de l'ordre de l'unité), on considère le contour fermé.

#### 5.1.3 Détection de contours en temps réel

Lors de la construction du montage de détection de contours par J. Pécréaux, les capacités informatiques en termes de stockage de données ne permettaient pas d'enregistrer les images haute résolution d'une vésicule fluctuante, et de détecter ensuite les contours en temps différé. J. Pécréaux a opté pour un processus de traitement des images en temps réel. Ainsi on peut n'enregistrer que les contours de la vésicule sans stocker les images. Le montage est équipé d'une caméra digitale de Type PULNIX, TM1040, qui acquiert des images  $984 \times 1010$  pixels, en 1024 niveaux de gris, et à une cadence de 30 images/seconde. Ces images sont enregistrées dans la mémoire vive d'un ordinateur (bi-processeur Xéon 1,5 GHz avec 512 Mo de mémoire vive) à l'aide d'une carte d'acquisition MATROX METEOR II DIGITAL 4/L en attente d'être traités par le programme de détection de contours. Ce programme analyse chaque image selon le processus expliqué dans les parties précédentes et qui est schématisé dans la figure 5.3. Les contours sont stockés dans le disque dur. Ce processus dure jusqu'à ce qu'il atteigne le nombre d'images à traiter défini au lancement du programme.

Au final on se retrouve avec un fichier qui contient les contours détectés, sous la forme de séries de coordonnées des points  $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ .

## 5.2 Des contours au spectre de fluctuations

### 5.2.1 Analyse de Fourier.

Pour analyser les fluctuations d'une vésicule, il faut mesurer l'amplitude des différents modes de déformation de celle-ci. Cela se fait en étudiant l'amplitude de ces

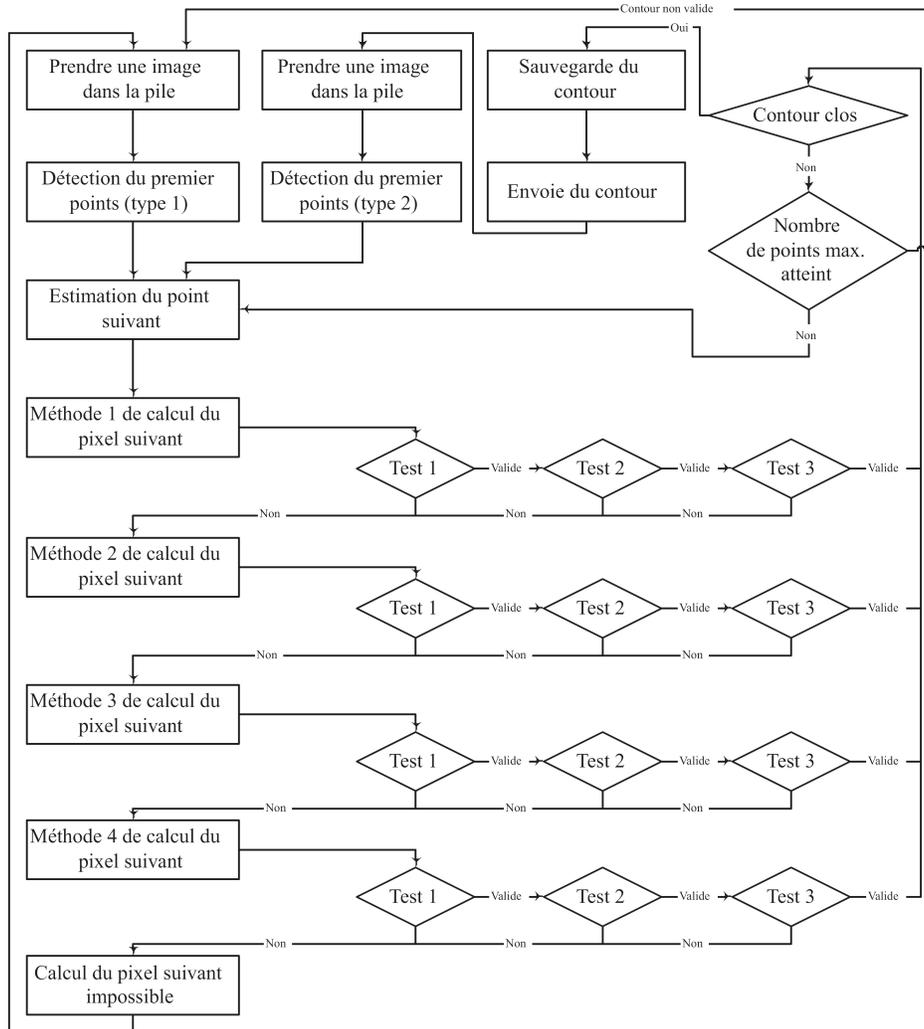


Fig. 5.3. Schéma de l'algorithme de détection de contours. [Pécéréaux, 2004]

modes dans chaque contour détecté. La variance de ces amplitudes sur un ensemble statistique de contours permet de mesurer le spectres de fluctuations de la vésicule.

On commence par transformer les coordonnées des points de chaque contour en coordonnées polaires. Pour alléger l'écriture on omettra les tildes de la notation des coordonnées.

La distance entre deux points successifs du contour s'écrit :

$$ds_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} \quad (5.3)$$

On peut définir les coordonnées du centre du contour comme la moyenne des coordonnées de chaque point du contour pondérées par la distance le séparant des points précédent et suivant :

$$x_c = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N x_i \times (ds_{i-1} + ds_i) \quad (5.4)$$

$$y_c = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N y_i \times (ds_{i-1} + ds_i) \quad (5.5)$$

où  $L = \sum_{i=1}^N ds_i$  la longueur du contour.

On transforme les coordonnées cartésiennes  $(x_i, y_i)$  en coordonnées polaires  $(r_i, \theta_i)$  par les relations suivantes :

$$r_i = \sqrt{(x_i - x_c)^2 + (y_i - y_c)^2} \quad (5.6)$$

et

$$\theta_i = \begin{cases} \arctan \frac{y_i - y_c}{x_i - x_c} & \text{si } x_i - x_c > 0 \\ \arctan \frac{y_i - y_c}{x_i - x_c} + \pi & \text{si } x_i - x_c < 0 \text{ et } y_i - y_c > 0 \\ \arctan \frac{y_i - y_c}{x_i - x_c} - \pi & \text{si } x_i - x_c < 0 \text{ et } y_i - y_c < 0 \end{cases} \quad (5.7)$$

Le développement du contour en série de Fourier s'écrit en coordonnées polaires :

$$r(\theta) = R \left( 1 + \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + b_n \sin(n\theta) \right) \quad (5.8)$$

avec

$$a_n = \frac{1}{\pi r^0} \sum_{i=1}^N [r_i \cos(n\theta_i) + r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1})] \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (5.9)$$

$$b_n = \frac{1}{\pi r^0} \sum_{i=1}^N [r_i \sin(n\theta_i) + r_{i+1} \sin(n\theta_{i+1})] \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (5.10)$$

$$r^0 = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N \left( \frac{r_i + r_{i+1}}{2} \right) (\theta_{i+1} - \theta_i) \quad (5.11)$$

et R distance moyenne entre le centre  $(x_c, y_c)$  et les points  $(x_i, y_i)$  du même contour.

On calcule le module du développement du contour en série de fourier complexe par la relation :

$$|c_n| = \sqrt{a_n^2 + b_n^2} \quad (5.12)$$

La variance de ce module nous permet de calculer le spectre de fluctuations de la vésicule :

$$\langle |u|^2(q) \rangle = \frac{\pi \langle R \rangle^3}{2} (\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n| \rangle^2) \quad (5.13)$$

avec

$$q = \frac{n}{\langle R \rangle}$$

et  $\langle R \rangle$  moyenne de  $R$  sur la série de contours.

### 5.2.2 Sélection des contours

Pour avoir une mesure fiable du spectre de fluctuations, il est nécessaire de retirer de la série de contours ceux qui sont aberrants. En effet il y a plusieurs raisons qui peuvent conduire à un contour qui ne reflète pas les fluctuations de la vésicule, comme la présence d'une poussière ou d'une autre vésicule à proximité. Dans toute série de détection il y a des contours de ce genre qu'il faut supprimer avant l'analyse.

Le programme d'analyse utilise deux critères pour déterminer si un contour est à rejeter ou à garder :

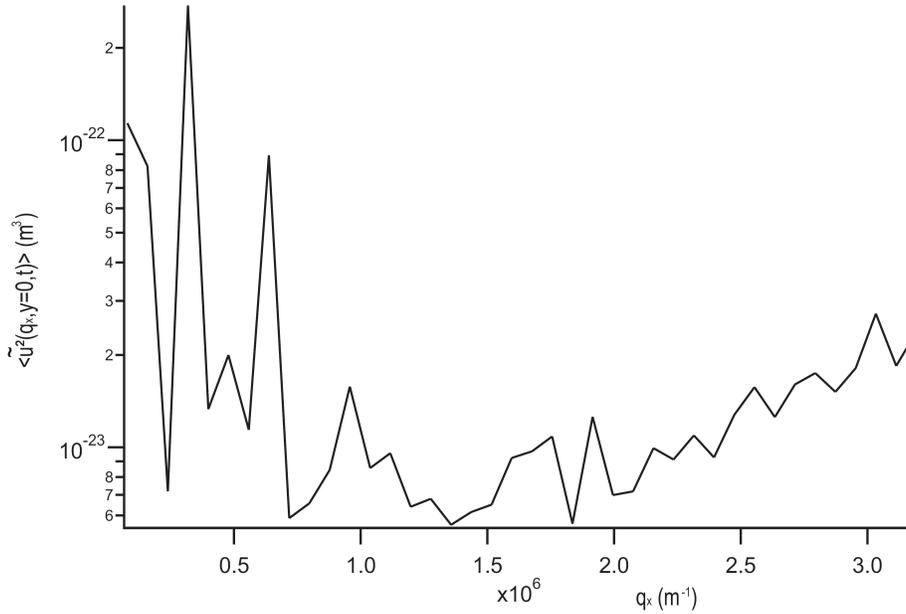
- **Le périmètre du contour** : Le principe de ce test est de dire que la longueur du contour  $L$  doit rester constante. On calcule la longueur moyenne sur la série de contours  $\langle L \rangle$ , et on élimine les contours qui s'écartent de plus de 10% de celle-ci. Ce test se base sur le fait que la membrane n'est extensible que par le dépliement de ses fluctuations sub-optiques, qui représentent 1 à 2 % de l'aire totale. La longueur du contour ne devrait donc pas varier de manière significative à cause de ces fluctuations.
- **Valeur limite pour l'amplitude des modes** : Pour ce deuxième test, on impose une valeur maximale pour le module des coefficients du développement en série de Fourier  $|c_n|$ . La valeur utilisée usuellement est

$$\forall n \in [1; 40] \quad |c_n| < 1$$

Ceci correspond à l'élimination des contours avec des fluctuations plus grandes que la taille de la vésicule. Ce test permet particulièrement de retirer les contours où la détection est revenue sur ses pas, le contour formant un arc de cercle dont la longueur reste proche de  $\langle L \rangle$ .

### 5.2.3 Précision de la détection, et artefacts

Pour déterminer la limite de détection de la méthode de mesure de spectres de fluctuations par reconnaissance de contours, J. Pécréaux l'a utilisée sur une tache d'encre

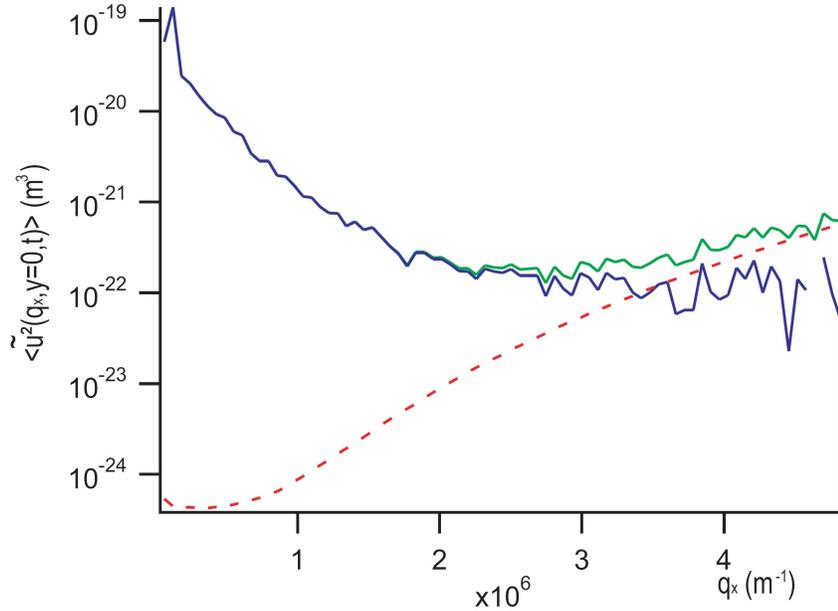


**Fig. 5.4.** *Spectre de fluctuations d'une tâche d'encre séchée sur une lame de verre : Mesure du bruit intrinsèque de la méthode. [Pécraux, 2004]*

séchée sur du verre. Celle-ci ne fluctue pas. Le spectre issu de cette mesure quantifie le bruit intrinsèque dû à la méthode elle-même. Ceci fixe la limite en amplitude des fluctuations mesurables. La détection du contour de la tâche d'encre donne le spectre de la figure 5.4. On remarque en particulier que l'amplitude mesurée est au plus de l'ordre de  $10^{-22} m^3$ . On arrêtera donc l'analyse des spectres pour les vecteurs d'onde au-delà desquels l'amplitude des fluctuations est inférieure à  $10^{-22} m^3$ .

On note aussi la remontée du spectre à grands vecteurs d'onde. Elle est due à la nature discrète de la détection. La position de la membrane est déterminée avec une précision de l'ordre de 0,1 pixel, ce qui veut dire que cette position contient une contribution aléatoire liée à cette précision finie. Un artefact similaire a été observé dans les expériences de mesure des fluctuations de polymères biologiques [Gittes et al. 1993]. Le programme d'analyse mis en place par Jacques Pécraux corrige cet artefact qui intervient principalement aux grands vecteurs d'onde.

Par ailleurs, le nombre minimum de pixels avec lequel on peut former une ondulation est 4. Ceci impose aussi la limite maximale de la gamme de vecteurs d'onde accessibles par cette technique. Pour les conditions expérimentales utilisées dans nos détections (présentée dans la suite de ce chapitre), la résolution de l'image est de 11 pixels/ $\mu m$ . On en déduit que le vecteur d'onde maximum qu'on peut mesurer est  $2,75 \cdot 10^6 m^{-1}$



**Fig. 5.5.** Correction du bruit dû à la résolution finie de la mesure. La courbe en vert est le spectre de fluctuations d’une vésicule SOPC où on voit l’artefact de remontée aux grands vecteurs d’onde. Le spectre corrigé est représenté en bleu. La courbe en pointillés rouges est l’estimation du bruit de résolution utilisée pour la correction. [Pécéréaux, 2004]

### 5.3 Du spectre de fluctuations aux modules élastiques de la membrane

Nous avons vu dans les sections précédentes comment on mesurait un spectre de fluctuations à partir des images d’une vésicule fluctuante. Ces spectres peuvent être exploités pour mesurer les propriétés physiques de la membrane telle que sa tension ou son module de courbure. Pour ce faire, il faut utiliser l’expression théorique du spectre de fluctuations et fitter les courbes expérimentales pour en extraire les valeurs des paramètres du modèle. Mais avant cela, il faut s’assurer que l’expression théorique décrit bien les conditions expérimentales d’acquisition. Nous allons présenter dans cette section comment adapter le spectre de fluctuations d’une membrane lipidique simple à nos conditions expérimentales, et les résultats de cette procédure de fit.

### 5.3.1 Spectre de fluctuations d'une section de la vésicule

Dans le modèle de Canhan-Helfrich, le spectre de fluctuations d'une membrane (modélisée comme une surface bidimensionnelle) dans un fluide tridimensionnel s'écrit :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa \mathbf{q}_\perp^4 + \sigma \mathbf{q}_\perp^2} \quad (5.14)$$

Cependant, pour acquérir un spectre de fluctuations par la méthode de détection de contours, on observe une coupe équatoriale de la vésicule. On étudie les fluctuations d'un anneau au lieu d'une surface. L'expression précédente ne permet donc pas d'analyser ces mesures. Il faut la modifier pour prendre en compte cet effet de coupe équatoriale. Pour cela il faut appliquer une transformée de Fourier inverse selon la composante  $q_y$  du vecteur d'onde en imposant  $y = 0$  :

$$\langle |u(q_x, y = 0)|^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle |u(q_x, q_y)|^2 \rangle dq_y \quad (5.15)$$

Le spectre de fluctuations adapté aux conditions d'observation de la membrane est donné par l'expression suivante :

$$\langle |u(q_x)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\sigma} \left[ \frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right] \quad (5.16)$$

### 5.3.2 Influence du temps d'intégration de la caméra

Les conditions d'observation ne sont pas le seul point à intégrer dans la modélisation. Le temps que prend l'acquisition d'une image (temps d'intégration de la caméra) a une grande influence sur l'amplitude des fluctuations mesurées. En effet, pour un temps d'acquisition donné, on va intégrer les fluctuations sur toute la durée d'ouverture de l'obturateur (comme avec un appareil photo) et les phénomènes dont la dynamique est plus rapide que ce temps ne sont pas différenciés. La dynamique est plus rapide pour les modes de petits longueurs d'onde (grands  $q_x$ ) et leur détection sera donc plus affectée par ces effets de temps d'ouverture de l'obturateur. On perd donc une partie de l'information sur les fluctuations lors de l'acquisition de l'image. Une procédure de fit utilisant seulement l'expression 5.16 surestimerait la rigidité de la membrane.

Pour introduire le temps d'intégration dans la modélisation, il faut connaître la dynamique de la membrane [Pécraux *et al.*, 2004]. En reprenant l'équation de Langevin décrite dans le chapitre 3, on peut calculer la fonction de corrélation spatiale et temporelle de la hauteur de la membrane, qui s'écrit :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp, t)u(\mathbf{q}'_\perp, t')| \rangle = 4\pi^2 \frac{k_B T}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \tau_m(\mathbf{q}_\perp) \exp\left(-\frac{t' - t}{\tau_m(\mathbf{q}_\perp)}\right) \quad (5.17)$$

Pour le système étudié, les effets de perméation sont négligeables devant la relaxation visqueuse. On notera la moyenne d'ensemble par  $\langle a \rangle$ , et la moyenne temporelle par  $\bar{a}$ . La moyenne de la fonction de corrélation sur le temps d'intégration  $\tau$  est donnée par la relation :

$$\langle |\bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)\bar{u}(\mathbf{q}'_\perp, t')| \rangle = \frac{2}{\tau^2} \int_{t_1=t}^{t_1=t+\tau} \int_{t_2=t_1}^{t_2=t+\tau} 4\pi^2 \frac{k_B T}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \tau_m(\mathbf{q}_\perp) \exp\left(-\frac{t_2 - t_1}{\tau_m(\mathbf{q}_\perp)}\right) dt_1 dt_2 \quad (5.18)$$

avec

$$\tau_m(\mathbf{q}_\perp) = \frac{4\eta q_\perp}{\sigma q_\perp^2 + \kappa q_\perp^4}$$

Ce qui donne finalement l'expression :

$$\begin{aligned} \langle |\bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)\bar{u}(\mathbf{q}'_\perp, t')| \rangle &= 8\pi^2 \frac{k_B T}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \times \tau_m \\ &\times \frac{\tau_m^2(q_\perp)}{\tau^2} \left[ \frac{\tau}{\tau_m(\mathbf{q}_\perp)} + \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)}\right) - 1 \right] \end{aligned} \quad (5.19)$$

On obtient une expression correspondant à nos conditions expérimentales en incluant l'effet de coupe discuté dans la partie précédente. Ceci est fait par l'intégration suivante :

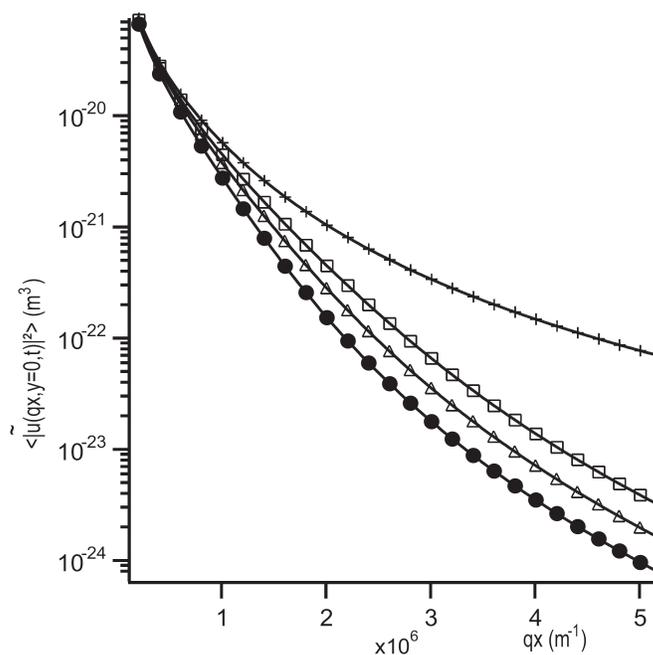
$$\begin{aligned} \langle |\bar{u}(q_x, y=0)|^2 \rangle &= \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{k_B T}{4\eta q_\perp} \tau_m \frac{\tau_m^2(q_\perp)}{\tau^2} \\ &\times \left[ \frac{\tau}{\tau_m(\mathbf{q}_\perp)} + \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)}\right) - 1 \right] dq_y \end{aligned} \quad (5.20)$$

Pour illustrer l'influence du temps d'intégration sur l'amplitude des fluctuations mesurées, J. Pécréaux a simulé des spectres avec différentes valeurs de  $\tau$  (figure 5.6). On voit que, pour une même membrane, plus on augmente le temps d'intégration plus l'amplitude des fluctuations mesurées diminue.

### 5.3.3 Mesure des modules élastiques de membranes passives

[Pécréaux *et al.*, 2004]

Maintenant que la modélisation théorique correspond aux conditions expérimentales, il est possible d'analyser les spectres de fluctuations pour mesurer les paramètres physiques de la membrane. Il faut cependant noter que la théorie est faite pour une membrane plane tandis que les mesures sont faites sur une vésicule sphérique, donc courbée. La forme globale n'affecte pas les fluctuations dont la longueur d'onde est

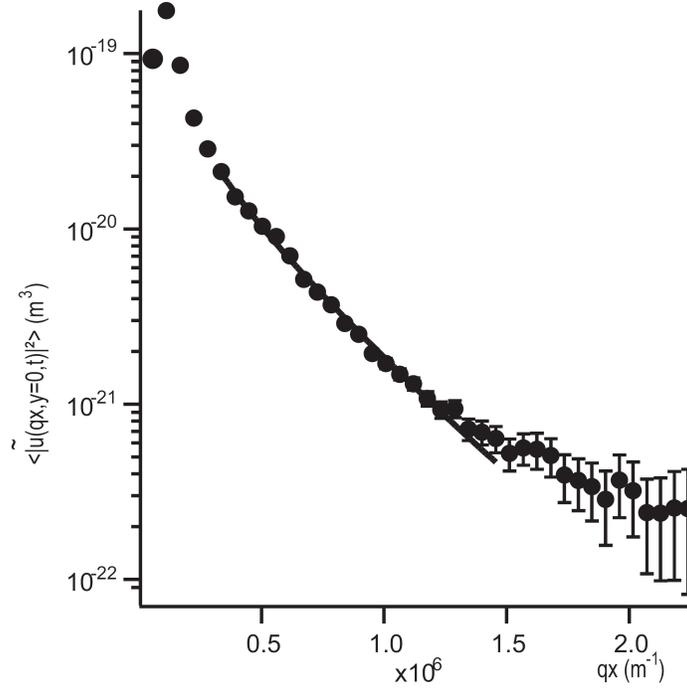


**Fig. 5.6.** Simulation numérique de l'effet du temps d'intégration sur l'amplitude mesurée des fluctuations pour une membrane caractérisée par  $[\sigma = 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = 10^{-19} \text{ J}$ ]. La courbe en "+" correspond à un temps d'intégration  $\tau$  infiniment court, celle en "□" à  $\tau = 8 \text{ ms}$ , celle en "△" à  $\tau = 16 \text{ ms}$ , et celle en "●" à  $\tau = 30 \text{ ms}$ . [Pécraux, 2004]

très petite par rapport à la taille de la vésicule. Mais à partir de quel mode peut-on considérer que la membrane d'une vésicule se comporte comme une membrane plane? En calculant et comparant les coefficients du développement de Fourier en géométrie plane  $|c_n|$  et en géométrie sphérique  $|c_n^s|$ , J. Pécraux a montré qu'au delà du mode 5 les différences entre ces deux géométries sont plus faibles que l'erreur expérimentale. On en conclut qu'en fittant les spectres expérimentaux à partir du mode 5 par l'expression théorique du spectre 5.20 (prenant en compte l'effet de coupe et du temps d'intégration), on peut mesurer la tension et le module de courbure de la vésicule. Comme l'expression théorique ne peut pas être calculée analytiquement, il est nécessaire de la calculer numériquement pour pouvoir l'utiliser comme fonction de fit.

Pour valider cette procédure expérimentale, J. Pécraux a étudié les paramètres physiques de membranes dont la composition a déjà été caractérisée par d'autres méthodes (Micropipettes, extraction de tubes ... etc.). Il a mesuré des spectres de fluctuations de membranes EPC, et SOPC. Il a aussi étudié le mélange SOPC:CHOL (1 :1) pour lequel il attendait une augmentation de la rigidité de courbure [Pécraux *et al.*, 2004].

Pour chaque vésicule, il a réalisé 10 expériences de détectations de contours successives



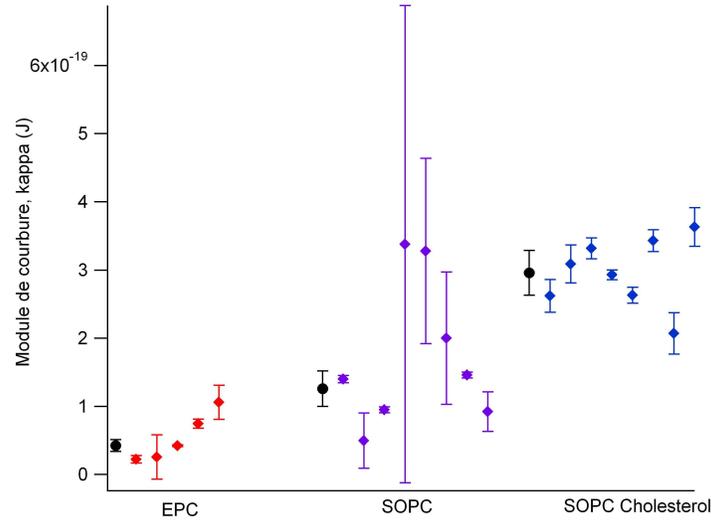
**Fig. 5.7.** Spectre de fluctuations d'une vésicule SOPC. En trait plein : fit par l'expression théorique tenant compte du temps d'intégration et de l'effet de coupe. Paramètres mesurés :  $\sigma = 1,7 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = 9,4 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ . [Pécrcéaux et al., 2004]

constituées de 2000 contours chacune. En fittant les spectres (indexés par  $i$  dans chaque série) comme expliqué précédemment, il a mesuré le module de courbure pour chaque spectre  $\kappa^i$  ainsi que la déviation standard sur cette valeur  $\sigma_{\kappa}^i$ . On calcule le module de courbure moyen pour chaque vésicule comme suit :

$$\bar{\kappa} = \frac{\sum_{i=1}^M \frac{\kappa^i}{(\sigma_{\kappa}^i)^2}}{\sum_{i=1}^M \frac{1}{(\sigma_{\kappa}^i)^2}} \quad (5.21)$$

Chaque valeur est pondérée par l'inverse de sa déviation standard, ainsi les mesures comportant les plus grandes incertitudes expérimentales contribuent moins à la moyenne. La figure 5.8 résume les valeurs du module de courbure mesurées pour différentes vésicules pour chacune des trois compositions suivantes : EPC, SOPC, et SOPC:CHOL 1:1). On voit une dispersion dans les valeurs de  $\kappa$  mesurées pour EPC et SOPC. Cette dispersion est moins importante pour les vésicule SOPC:CHOL 1:1.

Le module de courbure pour une composition est calculé en moyennant sur une dizaine de vésicules, en pondérant ces valeurs du module de courbure de chaque vésicule



**Fig. 5.8.** Module de courbure moyenné, mesuré par détection de contours, sur différentes vésicules pour trois composition différentes : EPC, SOPC, et SOPC:CHOL 1:1. Les points noirs correspondent à la valeur moyenne pondérée pour chaque composition. (Figure réalisée par Jacques Pécéréaux )

de la même manière. Les résultats de ces mesures, donnés dans le tableau 5.1, sont cohérents avec les mesures du module de courbure par d'autre techniques trouvées dans la littérature (voir 2.1). La figure

Lipide	Module de rigidité de courbure $\kappa$ ( $10^{-20}$ J)	Déviati on standard $\sigma_{\kappa}$ ( $10^{-20}$ J)
EPC	4,25	0,87
SOPC	12,6	2,6
SOPC :CHOL	29,6	3,3

**Tab. 5.1.** Mesure du module de rigidité de courbure par détection de contours pour les compositions suivantes : EPC, SOPC, SOPC:CHOL 1:1. [Pécéréaux et al., 2004]

## 5.4 Mesure des modules élastiques de membranes passives : nos expériences

Le but de notre projet est d'utiliser l'expérience de reconnaissance de contours pour caractériser l'effet de l'activité de protéines transmembranaires sur les propriétés physiques des membranes. Mais avant de faire cela, nous avons voulu également tester, nous même, la méthode sur des vésicules purement lipidiques (SOPC, EPC). Nous allons présenter dans cette section le protocole de la détection que nous avons adopté, ainsi que nos résultats et leur analyse.

### 5.4.1 Protocole

Nous avons utilisé pour ces expériences des vésicules électroformées à partir d'un dépôt de SOPC ou d'EPC, dans une solution de sucrose à 50 mM (protocole en annexe A.1 p. 163). Elles ont été transférées ensuite dans une solution de glucose également à 50 mM environ (l'osmolarité de cette solution a été ajustée pour avoir un excès de 3 à 4 mOs par rapport à la solution de sucrose) à l'aide d'un capillaire en verre fixé au bout d'une micropipette ( $2 - 20 \mu\text{l}$ ). Le transfert s'est fait dans une chambre d'observation faite de deux lamelles espacées par  $\sim 1 - 2 \text{ mm}$  de parafilm. La lamelle du dessous, sur laquelle sédimentent les vésicules à cause de la différence de densité entre le sucrose et le glucose, est recouverte de molécules PEG (5000) greffées pour la passiver. Pour relaxer la tension membranaire des vésicules, nous avons laissé la chambre d'observation ouverte pour permettre à l'évaporation d'augmenter la concentration du milieu extérieur et d'augmenter ainsi doucement son osmolarité. L'observation est faite avec un objectif Plan-Apochromat  $\times 100$  à immersion ( $N.A = 1,4$ ), illuminé par une lampe halogène (200 W) à travers un condenseur à immersion ( $N.A = 1,4$ ). Nous avons détecté entre 3 et 5 séries de contours (5000 contours par série) pour chaque vésicule. Les expériences sont réalisées avec le même montage expérimental que celui de Jacques Pécréaux (microscope, caméra, carte d'acquisition) et les mêmes programmes de traitement. Nous allons présenter dans la suite, les résultats de l'analyse de ces expériences.

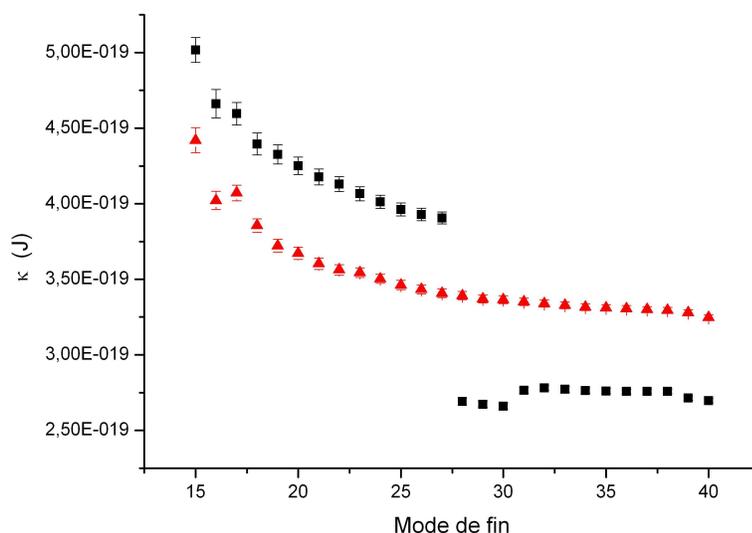
### 5.4.2 Résultats sur vésicules lipidiques

#### Mesure de la tension

Les mesures sur des vésicules nous ont permis de mesurer la tension  $\sigma$  et le module de courbure  $\kappa$  en fittant les spectres de fluctuations de vésicules constituées d'EPC ou de SOPC par l'expression 5.20. Les valeurs de tension mesurées sur plusieurs vésicules sont comprises entre  $2.10^{-7}$  et  $4.10^{-7}$  N/m. Les différentes valeurs obtenues pour des vésicules SOPC ont été regroupées dans le tableau C.2 en annexe p. 179. Cette gamme

de tension correspond aux vésicules ayant des fluctuations d'une amplitude détectable aisément optiquement. L'analyse de plusieurs spectres acquis sur une même vésicule montre que la mesure de la tension est fiable avec un écart type souvent inférieur à 10% (6% en moyenne). Ceci montre que la spectroscopie de fluctuations permet de mesurer la tension membranaire avec précision.

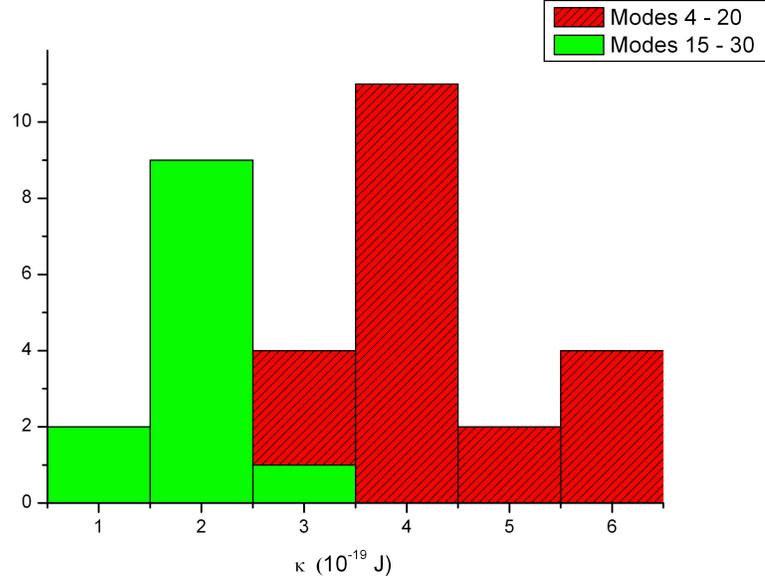
### Mesure du module de courbure.



**Fig. 5.9.** Mesure du module de courbure sur deux spectres d'une même vésicule. La gamme de modes utilisée pour le fit commence au mode 5 et s'arrête au mode indiqué sur l'abscisse du graphe.

**Gamme de modes utilisée pour le fit :** Les mesures du module de courbure, par contre, se sont avérées plus délicates. La valeur de  $\kappa$  donnée par la procédure de fit, sur un même spectre, dépendait de la gamme de modes utilisée. Nous avons fitté deux spectres d'une même vésicule en variant la gamme de modes utilisée. En commençant au mode 5, on a augmenté le numéro du mode de la fin de la gamme de 15 à 40. Les résultats de ces fits sont représentés dans la figure 5.9. On remarque que plus on élargit la gamme vers les grands modes, plus la valeur de  $\kappa$  mesurée diminue. On remarque aussi que l'on peut avoir des sauts dans les valeurs de  $\kappa$  (exemple : la courbe noire de la figure 5.9).

De plus, quand on fitte tous les spectres de vésicules SOPC entre les modes 4 et 20 on trouve un  $\kappa$  moyen de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-19} J$ . Quand on fitte ces mêmes spectres entre



**Fig. 5.10.** Histogrammes des valeurs du module de courbure  $\kappa$  mesurés sur des vésicules SOPC. Ils correspondent à des mesures de  $\kappa$  en fittant : les modes 5-20 pour l'histogramme rouge (rayé), et les modes 15-30 pour l'histogramme vert (clair).

les modes 15 et 30 on trouve un kappa moyen de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-19} J$ , donc une valeur 2 fois plus faible (figure 5.10), tandis qu'on s'attendait à retrouver des valeurs, dans la littérature, de l'ordre de  $30 k_B T$  pour des membranes SOPC (Tableau 2.1).

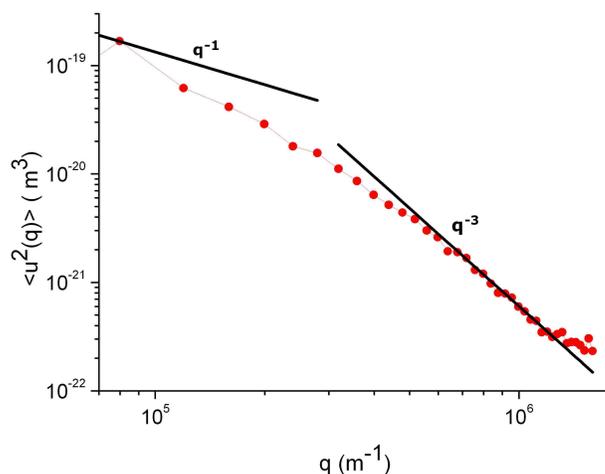
**Crossover et lois de puissance apparentes :** Pour mieux comprendre cette dépendance, étudions d'abord les limites de l'expression du spectre de fluctuations passif prenant en compte l'effet de coupe dû à la méthode d'observation :

$$\langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\sigma} \left[ \frac{1}{q} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q^2}} \right] \quad (5.22)$$

Aux très grands et très petits vecteurs d'onde cette expression se comporte comme une loi de puissance  $|u(q)|^2 \propto q^\nu$  :

- Pour  $q \ll q_c^2 = \frac{\sigma}{\kappa}$ , l'expression du spectre se simplifie et devient  $\langle |u(q)|^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{2\sigma} \times q^{-1}$ . C'est un régime dominé par la tension et  $\nu = -1$ .
- Pour  $q \gg q_c^2 = \frac{\sigma}{\kappa}$ , l'expression du spectre se simplifie et devient  $\langle |u(q)|^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{4\kappa} \times q^{-3}$ . C'est un régime dominé par le module de courbure et  $\nu = -3$ .

Quand on trace les courbes expérimentales en échelles logarithmiques, on voit que pour les vésicules SOPC les spectres ne sont pas linéaires (figure 5.12). Mais ceux des vésicules EPC le sont (figure 5.13 p. 117). L'exposant apparent mesuré à partir des spectres expérimentaux de EPC est de l'ordre de  $\nu \simeq -2$ . Ces constatations suggèrent que la gamme de vecteurs d'onde explorée par nos expériences correspond à la région de crossover entre le régime dominé par la tension et celui dominé par la courbure (figure 5.11). Et en effet, pour des valeurs de tension et de module de courbure typiques pour notre système ( $\sigma \sim 10^{-7}$  N/m et  $\kappa \sim 10^{-19}$  J),  $q_c$  est de l'ordre de  $10^6$  m<sup>-1</sup>, valeur qui est dans la gamme de vecteurs d'onde accessibles par la détection de contours. Nos observations se faisant dans le régime de crossover, la valeur de l'exposant  $\nu$ , de la loi de puissance apparente, va varier en fonction de la valeur de  $q_c$ . Il est donc nécessaire d'étudier cette dépendance.



**Fig. 5.11.** Spectre de fluctuation d'une vésicule EPC, mesuré par analyse de contours. Les droites en noir représentent les lois de puissance  $q^{-1}$  et  $q^{-3}$ .

Le tableau 5.2 montre les résultats de simulations de spectres utilisant l'équation 5.22 sur un domaine de valeurs de  $q$  correspondant aux mesures expérimentales, en prenant une tension  $\sigma = 4.10^{-7}$  N/m, et  $q_c^2$  variable. On mesure en particulier les lois de puissance de ces spectres. Quand la courbe n'était pas linéaire en échelle logarithmique, nous avons mesuré la pente au début (5 premiers modes), et à la fin (5 derniers modes) de la courbe. On en conclut que les lois de puissance apparentes des spectres reflètent la position du crossover par rapport au domaine de vecteur d'onde observé : si  $q_c$  diminue,  $\nu$  se rapproche de -3 (la loi de puissance aux grands  $q$ ) ; si  $q_c$  augmente,  $\nu$  se rapproche de -1 (la loi de puissance aux petits  $q$ ). On conclue de cette étude que le sens de variation de l'exposant  $\nu$  nous renseigne sur les variations du vecteur d'onde de coupure  $q_c$ . Cette

propriété nous sera utile dans l'étude comparative entre membranes actives et passives présentée dans le chapitre 6.

$q_c^2 (m^{-2})$	Loi de puissance $\nu$
$10^9$	-3,0
$10^{10}$	-2,5 (premiers modes) -3,0 (derniers modes)
$10^{11}$	-1,7 (premiers modes) -2,9 (derniers modes)
$10^{12}$	-1,2 (premiers modes) -2,2 (derniers modes)
$10^{13}$	-1,2

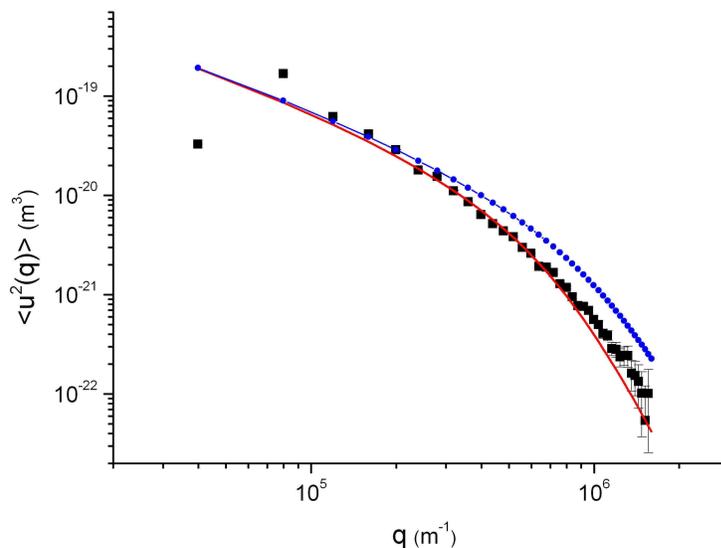
**Tab. 5.2.** *Variation de l'exposant  $\nu$ , obtenu à partir de fit de simulations de spectres, en fonction de  $q_c^2 = \frac{\sigma}{\kappa}$ .*

Nous concluons donc que la gamme de vecteurs d'onde explorée correspond au crossover entre le régime de tension et celui de courbure. On devrait être sensible à la fois à la tension et au module de courbure. Cependant aux grands vecteurs d'onde, l'amplitude est affectée de manière plus importante par l'effet du temps d'intégration, et le bruit numérique dû à la pixelisation de l'image. Ces effets sont corrigés mais ces corrections sont d'une amplitude de l'ordre du signal mesuré aux grands vecteurs d'onde. On s'attend donc à avoir des erreurs plus importantes, et une mesure moins fiable dans cette gamme.

**Mesure du module de courbure :** Pour mesurer le module de courbure  $\kappa$ , nous avons donc utilisé la procédure de fit utilisant l'expression 5.20 en se limitant aux modes 5 à 25, où l'amplitude des corrections est moins importante par rapport au signal mesuré (figure 5.12). Les résultats de ces fits pour les vésicules SOPC sont donnés en annexe tableau C.3 p. 180.

Si on utilise l'expression 5.21 pour calculer la valeur moyenne de  $\bar{\kappa}$  pour chaque vésicule on trouve des valeurs allant de  $2,8 \cdot 10^{-19}$  à  $3,9 \cdot 10^{-19}$  J (tableau C.3), donc trois ordres de grandeur plus élevées que la valeur généralement utilisée pour cette composition  $\kappa = 9 - 12 \cdot 10^{-20}$  J (tableau 2.1 p. 50). Des mesures similaires sur des vésicules EPC ont aussi montré une surestimation (d'au moins un facteur 2) du module de courbure par rapport à la valeur admise dans la littérature pour cette composition  $\kappa = 4 \cdot 10^{-20}$  J (tableau 2.1).

La mesure du module de courbure est très délicate comme le montre la dispersion des valeurs mesurées dans la littérature (exemple de SOPC tableau 2.1). Cependant le problème majeur que posent ces résultats est la valeur élevée du module de courbure,



**Fig. 5.12.** Spectre de fluctuations d'une vésicule SOPC (carrés noirs). La courbe rouge continue représente la fonction de fit 5.20 avec  $\sigma = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = 4,0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ . Ces valeurs sont obtenues en fittant les points expérimentaux entre les modes 5 et 25. Le spectre en ronds bleu est calculé avec l'expression 5.20 avec la même tension et  $\kappa = 1,2 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ , la valeur mesurée par Jacques Pécéréaux pour les membranes SOPC.

qui est en contradiction avec les mesures effectuées par J. Pécéréaux ( $1,2 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ) avec la même technique. Comment peut-on expliquer cette surestimation ?

### 5.4.3 Temps d'intégration et temps de pause

Pour trouver l'origine des écarts entre les expériences que nous avons conduites sur les vésicules lipidiques, et celles faites par J. Pécéréaux avec le même montage et les mêmes outils d'analyse, nous avons considéré la possibilité d'une différence du temps d'intégration de la caméra. En effet, quand on remplace la valeur du temps d'intégration  $\tau$  par 100 ms au lieu de 33 ms on retrouve des valeurs de  $\kappa$  cohérentes avec les valeurs de la littérature. Cependant la caméra a un temps d'intégration nominal de 33 ms, il est possible d'avoir des temps d'intégration plus faibles en variant le temps d'exposition, mais il n'est pas possible à priori d'avoir des temps d'intégration plus longs que 33 ms par image (30 images/s).

Pour s'assurer de ce point, nous avons mesuré le temps d'intégration de la caméra pour les réglages utilisés pour les acquisitions de contours. Un test simple consiste à

utiliser le shutter de la caméra. Les réglages SM1 et SM2 de la caméra imposent un temps d'acquisition de  $\frac{1}{60} = 16,67ms$  et  $\frac{1}{125} = 8ms$  respectivement. Le rapport de l'intensité lumineuse sur des images prises avec des temps d'intégration différents ( $I_0$  correspondant à l'intensité mesurée dans les conditions typiques de nos mesures,  $I_{60}$  celle pour le réglage SM1, et  $I_{125}$  celle pour le réglage SM2), doit être égale au rapport de ces temps d'intégration. On a donc pour SM1

$$\tau = \frac{I_0}{I_{60}} 16,67ms$$

et on trouve  $\tau = 33ms$ . En faisant la même chose pour SM2 on trouve  $\tau = 37ms$ . On conclut que le temps d'intégration de la caméra est bien  $33ms$ . Les différences entre nos résultats et ceux de J. Pécréaux ne peuvent être expliqués par des temps d'intégration différents.

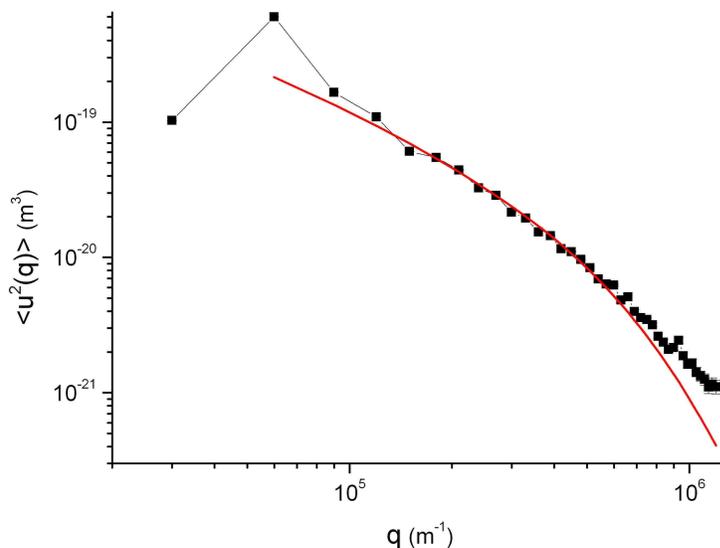
En analysant les différences entre nos expériences et celles de J. Pécréaux on a constaté la chose suivante : le temps d'attente entre les contours successifs est différent dans les deux cas. Dans les expériences de Pécréaux, il n'y avait pas de temps de pause, tandis que dans les nôtres on a un temps de pause de l'ordre de 30 ms. Cette différence est probablement due à des problèmes matériels qui ont réduit la vitesse d'écriture sur le disque dur. Normalement, grâce à l'ergodicité du système seul le nombre de contours influence la statistique et non l'écart temporel entre les images. Pour trancher cette question, il a effectué son analyse avec l'expression sans temps de pause sur une série d'image, puis sur cette même série mais en enlevant un contour sur deux. Le résultat de ce test n'a montré aucune différence entre les deux mesures à part une augmentation de l'écart type pour la statistique avec une moitié d'événements.

La différence entre nos expériences et les résultats de Jacques Pécréaux ne provient pas de problèmes liés à l'acquisition des images.

#### 5.4.4 Fonction de fit et taille des vésicules

##### Fonction de fit

Le fit des spectres de fluctuations (corrigés de l'effet du bruit numérique) montre un écart entre les points expérimentaux et la fonction de fit aux grands vecteurs d'onde (généralement au-delà des modes 25-30). Les points expérimentaux sont systématiquement au-dessus de la fonction de fit. De plus, la forme de la fonction de fit est différente des courbes expérimentales quand elles sont tracées en échelle logarithmique comme on peut le voir sur la figure 5.13 avec une vésicule EPC. La procédure d'intégration numérique de la fonction de fit pourrait être à l'origine de cet écart systématique, car elle peut générer des erreurs qui deviennent de l'ordre de grandeur du signal au grands vecteurs d'onde. De même les points expérimentaux ont été corrigés à cause des effets de résolution finie. Cette correction est aussi de l'ordre du signal au grands vecteurs d'onde (figure 5.5 p. 104).



**Fig. 5.13.** Spectre de fluctuations d'une vésicule EPC (carrés noirs). La courbe rouge continue représente la fonction de fit 5.20 avec  $\sigma = 1,4 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = 2,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ . Ces valeurs sont obtenues en fittant la courbes expérimentale entre le mode 5 et 25.

### Taille des vésicules

Une différence importante entre nos expériences et celles de Jacques Pécrcéaux est la taille des vésicules utilisées pour les mesures. Nous avons réalisé cette différence à la fin de la thèse. Jacques Pécrcéaux avait mesuré des spectres sur des vésicules d'un diamètre allant de 15 à 30  $\mu\text{m}$ , tandis que nos mesures ont été réalisées sur des vésicules d'un diamètre allant de 40 à 70  $\mu\text{m}$ . En effet, le plan équatorial de vésicules de cette taille est plus éloigné de la surface de verre. Ceci permettait de réduire les perturbations optiques qu'elle induit, et facilitait ainsi la détection des contours. De plus, on a peu d'objets pouvant gêner la détection à cette hauteur dans l'échantillon, on a en particulier peu de grosses vésicules. Cependant, plus la taille de la vésicule est grande, plus son spectre de fluctuations est affecté par la déformation due à la gravité [Henriksen et Ipsen, 2002]. En se basant sur les résultats de [Henriksen et Ipsen, 2002], on peut estimer que ces effets ne sont plus négligeables pour des vésicule d'un diamètre au-delà de 50  $\mu\text{m}$ . Comme c'est le cas pour nos vésicules, il se peut que ce soit l'origine de la surestimation de la valeur du module de courbure.

On s'attendrait que la gravité affecte uniquement les premiers modes (petits vecteurs d'onde), mais [Henriksen et Ipsen, 2002] ont montré, par un calcul en harmoniques sphériques, que la gravité pouvait aussi affecter le spectre de fluctuations aux grands

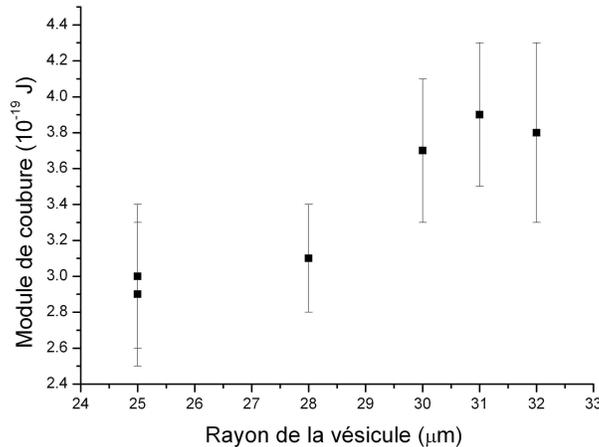
vecteurs d'onde, mais dans une plus faible mesure. Les auteurs de cet article dérivent ainsi un critère pour déterminer les cas où les effets de gravité sont négligeables :

$$g_0 < \frac{25}{28} [12 + \Sigma] \quad (5.23)$$

avec  $g_0 = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot R^4}{\kappa}$  et  $\Sigma = \frac{\sigma \cdot R^2}{\kappa}$  où  $R$  est le rayon de la vésicule,  $g$  la pesanteur, et  $\Delta\rho$  la différence de masse volumique entre les solutions internes et externes de la vésicule (généralement la solution interne est plus dense pour permettre la sédimentation des vésicules). On peut à partir de ce critère calculer un rayon maximum  $R_{max}$  de la vésicule au-delà duquel les effets de gravité ne sont plus négligeables, et qui s'écrit :

$$R_{max} = \sqrt{\frac{25\frac{\sigma}{\kappa} + \sqrt{\left(25\frac{\sigma}{\kappa}\right)^2 + 3,36 \cdot 10^4 \frac{\Delta\rho \cdot g}{\kappa}}}{56\frac{\Delta\rho \cdot g}{\kappa}}} \quad (5.24)$$

Les vésicules utilisées dans nos expériences d'analyse de contours ont une tension typique de  $\sigma = 10^{-7} N/m$ , et un module de courbure de l'ordre de  $\kappa = 10^{-19} J$ . L'intérieur de la vésicule est constitué d'une solution de sucre à 50 mM. Le milieu extérieur est une solution de glucose aussi à 50 mM. La relaxation de la tension se faisant par évaporation, on s'attend à une augmentation de ces concentrations. On les estime à 60 mM. Dans ces conditions  $\Delta\rho \simeq 10 kg/m^3$ . Quand on calcule la valeur de  $R_{max}$  en utilisant ses valeurs typiques, on trouve  $R_{max} \simeq 30 \mu m$ . C'est l'ordre de grandeur de la taille des vésicules que nous avons utilisé pour nos mesures.



**Fig. 5.14.** Valeurs mesurées pour le module de courbure sur différentes vésicules SOPC, tracées en fonction du rayon de chaque vésicule.

En analysant les résultats des mesures du module de courbure de vésicules SOPC, on remarque que la valeur de  $\kappa$  mesurée dépend du rayon. Ainsi pour les vésicule d'un rayon de l'ordre de  $25 \mu m$ ,  $\bar{\kappa}$  est de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-19} J$ , tandis que pour les vésicules d'un rayon entre  $30$  et  $33 \mu m$ ,  $\bar{\kappa}$  est compris entre  $3,7$  et  $4 \cdot 10^{-19} J$  (données en annexe C.3 p. 180). On trouve une tendance similaire pour les mesures de  $\kappa$  effectuées sur des vésicules EPC (données en annexe C.1 p. 178). On en conclut que plus le rayon de la vésicule est grand (au-delà de  $2025 \mu m$ ) plus la valeur du module de courbure mesurée est élevée (figure 5.14). Nos mesures seraient donc affectées par des effets de gravité qui ne sont pas pris en compte dans l'expression de fit utilisée. Pour l'instant, il n'existe, à notre connaissance, aucun développement théorique qui donne l'expression du spectre de fluctuations incluant ces effets de pesanteur.

Comme nous le verrons plus loin (section 6.5.2 p. 146), nous avons réalisé des mesures sur des vésicules (EPC + BR) de plus petite taille ( $10$  à  $20 \mu m$ ) préparées selon le protocole de reconstitution présenté dans la section 4.1.2 p. 79. On mesure pour les spectres passifs (illumination non-actinique) un module de courbure de  $5 \cdot 10^{-20} J$ , ce qui correspond bien aux résultats des mesures de pipettes pour cette composition [Manneville *et al.*, 2001]. Les résultats de ces expériences seront présentés dans la chapitre suivant (figure 6.11) p. 147. Le tableau C.4 résume les résultats des mesures effectuées sur des vésicules EPC-BR. La taille des vésicules utilisées semble donc avoir une grande influence sur la mesure du module de courbure.

**Conclusion :** On conclut de ces expériences de spectroscopie de fluctuations sur vésicules géantes passives que cette technique permet une mesure précise de la tension membranaire. Cependant la détermination précise du module de courbure par cette méthode s'avère très délicate.



---

## Spectroscopie de fluctuations de vésicules géantes actives

---

DANS LE BUT DE MESURER le spectre de fluctuation de membranes hors-équilibre, nous avons utilisé la méthode de détection de contours. Des premières expériences avaient été effectuées par Jacques Pécraux à la fin de sa thèse. Nous allons commencer ce chapitre par un résumé de ces expériences et des questions qu'elles soulevèrent, qui justifiaient la poursuite de ce travail. Nous poursuivrons en décrivant notre démarche pour obtenir des résultats systématiques, les difficultés rencontrées, et finalement les résultats que nous avons obtenus.

### 6.1 Effets attendus : Simulations

Nous avons vu dans le chapitre 4 que l'activité de protéines transmembranaires change les propriétés physiques de la membrane comme cela a été mesuré par les expériences de micropipettes. (Diminution du rapport  $\frac{\kappa}{kT}$  d'un facteur allant de 2 à 3 suivant la protéine étudiée.)

Les différents modèles théoriques décrivant le comportement des membranes hors-équilibre, prévoient tous l'existence de contributions additionnelles aux fluctuations, dues à l'activité protéique. Cependant, les résultats des expériences de micropipette ne permettent pas d'estimer l'importance relative des différents effets hors-équilibre prévus. Ceux-ci changent de façon différente l'amplitude des fluctuations des différents modes et donc changent le spectre de fluctuations.

La mesure de ce spectre est un moyen de quantifier les effets hors-équilibre dus à l'activité, et de les relier aux différents couplages pris en compte par les modèles théoriques. La première étape consiste à comparer les spectres mesurés dans des conditions où les

protéines pompent, à ceux où elles sont inactives. Ceci nous permettra de déterminer les échelles de longueurs pour lesquelles ces effets sont les plus forts.

Pour donner une idée concrète des prédictions d'un de ces modèles, nous présenterons, dans la suite, des simulations basées sur le modèle Ramaswamy-Toner-Prost [Ramaswamy *et al.*, 2000]. Nous avons vu dans le chapitre 3 l'expression du spectre de fluctuation d'une membrane active que prédit le modèle RTP complet dans le cas où les effets de perméation sont négligeables (adapté au cas des membranes lipidiques) [Manneville *et al.*, 2001]. La prise en compte de l'effet de coupe dû à la méthode d'observation en microscopie donne l'expression suivante pour ce spectre :

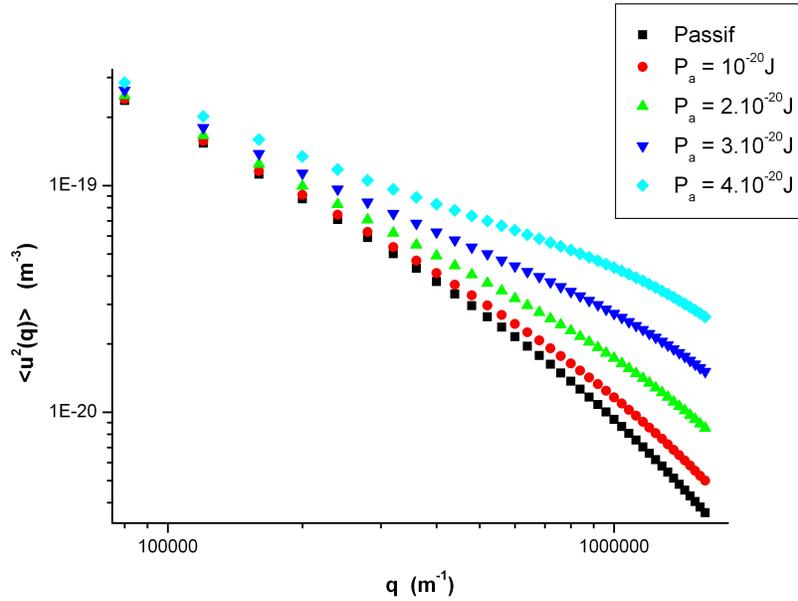
$$\begin{aligned} \langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\sigma} \left[ \frac{1}{q} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa_a^e} + q^2}} \right] + \frac{k_B T \mathcal{P}_a w (\mathcal{P}_a w + \Xi)}{\chi \sigma (\kappa_a - \kappa_a^e)} \\ \times \left[ \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa_a} + q^2}} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa_a^e} + q^2}} \right] \end{aligned} \quad (6.1)$$

avec :

- $\mathcal{P}_a$  l'amplitude du dipôle hydrodynamique actif.
- $\kappa_e = \kappa - \frac{\Xi^2}{\chi}$  module de courbure renormalisé par la présence des protéines.
- $\kappa_a = \kappa - l_2 \mathcal{P}_a w \phi - \mathcal{P}_a w \Xi / \chi$ , module de courbure renormalisé par l'activité protéique.
- $\kappa_a^e = \kappa^e - l_2 \mathcal{P}_a w \phi - \mathcal{P}_a w \Xi / \chi$ , module de courbure renormalisé par la présence des protéines et leur activité.
- $\Xi$  coefficient de couplage entre la courbure membranaire et la concentration de protéines.

Dans le cas particulier de la BR, les expériences de micropipettes conduites par JB. Manneville ont montré que l'incorporation de la protéine n'induit pas de renormalisation du module de courbure ( $\kappa^e \simeq \kappa$  et  $\kappa_a^e \simeq \kappa_a$ ). On en conclut que le coefficient de couplage de la densité de protéines à la courbure  $\Xi$  est plus petit que  $4 \cdot 10^{-29} J.m$  (correspond à  $\kappa_a - \kappa_a^e \simeq k_B T$  limite de la précision sur la mesure de  $\kappa$  par l'expérience de micropipettes). Ce paramètre de couplage  $\Xi$  peut être estimé théoriquement comme cela a été fait dans [Manneville *et al.*, 2001] en prenant en compte des effets de flexo-électricité. Celà donne  $\Xi = w k_B T \simeq 2 \cdot 10^{-29} J.m$ . Pour des valeurs de cet ordre, on ne s'attend pas à une renormalisation de  $\kappa$  mesurable expérimentalement. Rappelons que dans le cas de la  $C_a^{+2}$  ATPase, les expériences de micropipettes ont permis de mesurer  $\Xi \simeq 8 \cdot 10^{-29} J.m$  et  $\mathcal{P}_a = 9 k_B T$ .

Les courbes de la figure 6.1 présentent des spectres issus de simulations utilisant l'équation 6.1. Il est à noter que le temps d'intégration de la caméra n'est pas pris en compte. Ces simulations montrent que, pour des valeurs des paramètres physiques,



**Fig. 6.1.** Simulation de l'influence de la valeur du dipôle hydrodynamique sur le spectre de fluctuations. La courbe en carrés noir correspond au spectre passif avec  $\sigma = 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa = 4 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ . Les autres courbes correspondent à des spectres actifs avec  $\Xi = 2 \cdot 10^{-29} \text{ J.m}$ ,  $l_2 = 5 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ,  $\chi = 4 \cdot 10^{-37} \text{ J.m}^2$  (correspond à un gaz parfait de protéines de densité  $n_\Sigma = 10^{16} \text{ m}^{-2}$ ), et un dipôle hydrodynamique  $\mathcal{P}_a$  variable :  $10^{-20} \text{ J}$  (ronds rouges) ;  $2 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  (triangles verts) ;  $3 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  (triangles bleus) ;  $4 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  (losanges bleus clairs).

issues des expériences de micropipettes et des estimations de [Manneville *et al.*, 2001], on s'attend à mesurer des différences mesurables expérimentalement, entre les spectres de vésicules actives et ceux de vésicules passives à petits vecteurs d'onde, mais de façon plus marquée aux grands vecteurs d'onde. Ces différences augmentent avec la valeur du dipôle de force hydrodynamique lié à l'activité protéique. C'est dans le but de mesurer ces effets actifs, en particulier aux grands vecteurs d'onde, que J. Pécraux avait développé le montage de détection de contours, en cherchant à optimiser le système pour accéder aux plus grands vecteurs d'onde possibles.

**Conclusion :** Le modèle RTP avec dipôle hydrodynamique prévoit une amplification des fluctuations, due à l'activité protéiques, particulièrement marquée aux grands vecteurs d'onde.

## 6.2 Résultats antérieurs [Pécreaux, 2004]

Nous allons présenter dans cette section le protocole de préparation des protéoliposomes géants utilisé par Jacques Pécreaux pour réaliser ses expériences de détection de contours, ainsi que les résultats qu'il a obtenus et leur interprétation.

### 6.2.1 Protocole de préparation des vésicules

Les vésicules actives utilisées étaient constituées de protéines BR reconstituées dans des membranes de SOPC selon le protocole [Girard *et al.*, 2004a] à un rapport lipides/BR de 7 w/w (rapport massique soit un rapport molaire de 230). Ce rapport correspond à la concentration maximale de protéines pour laquelle on obtient des vésicules de taille et de forme adaptées à la détection de contours. L'électroformation se faisait dans une solution contenant du tampon MOPS à 1mM ramené à  $\text{pH} = 7,1$  avec de la soude, du KCl à 2mM, et du sucrose à 50mM. Les vésicules étaient transférées, par la suite dans une solution de glucose à 52mM, contenant du MOPS à 1mM ramené à  $\text{pH} = 7,1$  avec de la soude, et du KCl à 3 mM. Ce transfert était effectué à l'aide d'un capillaire de 500 micromètres de diamètre, relié au système de micromanipulation pour contrôler finement l'aspiration et l'expiration des vésicules.

Pour effectuer la détection de contours de protéoliposomes à l'équilibre, Jacques Pécreaux a utilisé un éclairage rouge en ajoutant un filtre devant lampe xénon utilisée pour l'éclairage en transmission. Les spectres actifs ont été acquis en remplaçant ce filtre rouge par un filtre jaune qui transmet la lumière actinique.

Pour mesurer le spectre de fluctuations par détection de contours, il faut que la vésicule soit suffisamment fluctuante à l'échelle optique. Ceci revient à choisir des vésicules qui ont une tension assez faible pour permettre des fluctuations de forme d'une amplitude de l'ordre du micron. En laissant la chambre ouverte d'un côté, Jacques Pécreaux réussissait à diminuer la tension des vésicules sans que celles-ci ne relaxent leur excès d'aire dans des structures filamenteuses ou des agrégats lipidiques (catons).

### 6.2.2 Résultats de Jacques Pécreaux

Les expériences conduites par Jacques Pécreaux lui avaient permis d'aboutir à deux conclusions principales :

- L'incorporation de la protéine modifie la forme du spectre de fluctuations. Celui-ci n'est pas superposable aux spectres de vésicules purement lipidiques.
- L'activité protéique modifie les spectres de façon variable et non triviale. Les potentiels transmembranaires que l'activité de pompage produit, et l'incorporation dissymétrique des protéines pourraient être à l'origine de cette variabilité.

Nous allons présenter, dans ce qui suit, les évidences expérimentales sur lesquelles s'appuient ces conclusions.

### Effet de l'incorporation des protéines

La comparaison du spectre de fluctuations d'une vésicule SOPC contenant de la BR avec un spectre d'une vésicule purement SOPC de même tension, montre un écart important entre les deux (figure p. 191 de [Pécreaux, 2004], reproduite en annexe C.1 p. 182). Le spectre de la vésicule contenant la protéine est systématiquement au-dessus du spectre SOPC pur, pour les grands vecteurs d'onde, tendant de façon surprenante vers une valeur constante.

La procédure de fit (qui permet de mesurer le module de courbure dans cette région précisément) donne des valeurs de  $\kappa$  plus faible de plus d'un ordre de grandeur ( $\kappa$  inférieur à kT) que ce qui a été mesuré pour SOPC pur ( $\kappa \simeq 30$  kT). Cependant, l'ajustement des courbes expérimentales avec une expression correspondant à une membrane passive avec une rigidité de courbure réduite par la présence des protéines n'était pas satisfaisant. Rappelons que les expériences de micropipettes effectuées par J.B. Manneville sur des membranes contenant la BR à des concentrations nominales encore plus importantes, mais avec des membranes à base d'EPC, n'a pas mesuré de changement du module de courbure dû à l'incorporation de la protéine.

### Effet du gradient électrochimique et/ou du potentiel transmembranaire

Jacques Pécreaux avait remarqué qu'un spectre acquis en lumière rouge (passif) après une période d'activation de la BR (illumination en lumière jaune) est situé en-dessous du spectre mesuré après une longue période d'attente, suffisamment longue pour permettre la relaxation d'un éventuel gradient de protons à travers la membrane (figure p. 193 de [Pécreaux, 2004], reproduite en annexe C.2 p. 183). Il avait suggéré que ce potentiel transmembranaire pouvait diminuer l'amplitude des fluctuations aux grands vecteurs d'onde.

L'hypothèse du potentiel transmembranaire n'est, cependant, pas la seule explication possible. [Kahya *et al.*, 2002] ont montré que la BR a tendance à s'agréger sous l'effet de son activité. Il est donc possible que les différences observées soient dues à des interactions interprotéiques différentes.

### Effet de l'activité de la BR

En comparant les spectres passifs (éclairage rouge) et les spectres actifs (éclairage jaune) d'une même vésicule contenant de la BR, Jacques Pécreaux avait observé des changements extrêmement variables dus à l'activité de la BR. Dans certaines expériences, les spectres actifs étaient au dessus des spectres passifs (ce qui correspond aux prévisions [Manneville *et al.*, 2001]), tandis que dans d'autres, les spectres actifs étaient soit superposés, soit en dessous des spectres passifs (figures p. 194-196 de [Pécreaux, 2004], reproduites en annexe C.3, C.4, et C.5.). Notons que la forme de

ces spectres, avec une amplitude constante aux grands vecteurs d'onde, était également très surprenante, car prédite par aucun modèle théorique.

Jacques Pécréaux a interprété ces résultats en formulant l'hypothèse selon laquelle il y aurait une concurrence entre l'effet de l'activité protéique (qui tendrait à augmenter les fluctuations), et l'effet d'un gradient de protons qui agirait dans le sens inverse en diminuant les fluctuations. Le résultat de cette concurrence (positionnement du spectre actif par rapport au passif) dépendrait de la dissymétrie du nombre de protéines orientées dans un sens ou dans l'autre, qui change d'une vésicule à l'autre.

Dans une configuration proche de la symétrie (autant de BR  $\uparrow$  que  $\downarrow$ ), le potentiel membranaire augmenterait lentement à cause des fuites passives, et n'aurait pas le temps, sur la durée d'une expérience, de devenir suffisamment fort pour compenser l'effet de l'activité. Ceci conduirait à un spectre actif au dessus du spectre passif.

Inversement, si la dissymétrie est très grande, les protéines réussiraient à construire un potentiel fort durant le temps de l'acquisition qui finit par inhiber l'activité de pompage de la BR. Dans ce cas de figure, l'effet du potentiel dominerait, et on aurait une courbe active en dessous de la courbe passive.

Dans le cas intermédiaire, les deux effets seraient du même ordre de grandeur, et ceci ferait que les spectres actifs et passifs se superposent.

Ces propositions étaient spéculatives car il n'était pas possible de mesurer l'asymétrie d'orientation des protéines pour chaque expérience. Ces expériences ont été réalisées à la fin de la thèse de Jacques Pécréaux et n'ont, peut-être, pas été reproduites suffisamment de fois. De plus, à ce moment-là, on ne disposait d'aucune étude théorique qui permette d'anticiper l'effet d'un potentiel transmembranaire sur le spectre de fluctuations d'une membrane. La forme inattendue de ces spectres, et leur grande variabilité suggéraient de refaire ces expériences dans des conditions très bien contrôlées, et en nombre suffisant pour vérifier la reproductibilité de ces mesures.

**Conclusion : Les premières mesures de spectres de fluctuations conduites par Jacques Pécréaux sur les membranes actives donnaient des résultats variables, difficiles à interpréter.**

### **6.3 Nos mesures de spectres de fluctuations suivant le protocole de reconstitution de Jacques Pécréaux**

Nous allons présenter dans cette section les résultats de nos expériences réalisées dans les mêmes conditions que celles de Jacques Pécréaux . Nous présenterons d'abord le protocole utilisé pour effectuer ces expériences, pour ensuite en discuter les résultats.

### 6.3.1 Protocoles

#### Préparation des vésicules, et leur transfert

Pour reproduire les conditions des expériences de Jacques Pécéréaux, nous avons utilisé le même protocole de préparation des protéoliposomes géants par reconstitution en détergent (protocole détaillé en annexe A.2 p. 165) [Girard *et al.*, 2004a]. La BR est d'abord solubilisée dans du Triton X 100 à un rapport massique détergent/protéines de 5 une nuit à 4°C avec une agitation douce. Les lipides (EPC) sont aussi solubilisés dans le même détergent à un rapport massique détergent/lipides de 1,3, avec une agitation douce pendant une demi-heure. Les protéines et lipides solubilisés sont mélangés à un rapport massique lipides/protéines de 7 (soit un rapport molaire lipides/protéines de 230). Après une agitation douce pendant 1 heure, on commence à ajouter les biobeads (SM2 Bio-Beads 25-50 mesh, BioRad, Hercules, CA), pour absorber le détergent, à un rapport massique biobeads/détergent entre 10 et 15, puis on laisse sous agitation douce pendant 1 heure. On répète cette étape trois fois. A la fin on se retrouve avec une solution de SUVs (Small Unilamellar Vesicles) contenant la BR. On dépose des gouttes de 2  $\mu$ l de cette solution diluée (avec eau ou tampon) à une concentration de 0,8 mg/ml en lipides sur des lames ITO. On laisse ce dépôt sécher partiellement dans une atmosphère de vapeur saturante d'une solution saturée de NaCl.

Les vésicules ont été électroformées, à partir de ce dépôt dans une solution de sucrose à 50 mM contenant un tampon MOPS :TRIS 2 :1 (molaire) à 1 mM qui assure la neutralité de la solution à pH = 7,0 et du KCl à 2 mM qui favorise l'activité de la protéine. Les vésicules ainsi formées sont transférées dans une solution de glucose à 50 mM contenant du tampon MOPS :TRIS 2 :1 (molaire) à 1 mM et du KCl à 5 mM. Les osmolarités des deux solutions (d'électroformation, et de transfert) sont ajustées, par ajout d'eau pure, de telle sorte que celle de la solution de transfert est plus élevée de 6 à 8 % que celle de la solution d'électroformation, dans le but d'avoir des vésicules de faible tension dans la chambre d'observation.

L'étape de pousse des vésicules géantes, à partir du dépôt de {lipides + protéines}, est une étape délicate avec laquelle on a eu souvent des problèmes. Ainsi des conditions pour lesquelles les vésicules poussaient bien à un moment, pouvaient ne plus donner de résultats à un autre. Plusieurs facteurs rentrent en jeu dans l'étape de séchage, dont le mouillage de la goutte de solution de SUVs sur la surface ITO, le volume de la goutte, la réorganisation des membranes lors du séchage, et les défauts de la surface ITO. Pour améliorer le rendement de cette étape, nous avons ajouté au mélange de lipides EPC, des lipides PEG 2000 à hauteur de 5% en masse. La répulsion stérique due aux polymères favorisant le détachement des membranes, la pousse des GUVs est meilleure et les vésicules ont moins de défaut. Nous stockons habituellement les vésicules électroformées dans les chambre de pousses à 4°C pour limiter la dégradation des lipides et des protéines. Cependant, les vésicules avec lipides PEG 2000 sont très affectées par un stockage de 24 heures à 4°C (changement de morphologie, absence de vésicule de

forme et de taille adaptées à la détection de contour). Cette dégradation de la forme des vésicules pourrait être due à des interactions entre molécules PEG induites par la baisse de température. Nous avons dû préparer des pousses quotidiennes, et effectuer les mesures de contours le jour même.

Les vésicules sont des fluides bidimensionnels, elles ne peuvent donc pas résister à des contraintes de cisaillements. Pour réduire ces contraintes qui risquent d'endommager les vésicules, nous avons d'abord utilisé le même protocole de transfert que Jacques Pécréaux. Nous avons ensuite remarqué qu'on obtenait des résultats similaires en les transférant à l'aide d'un capillaire de verre, de 1 mm de diamètre, monté au bout d'une pipette Gilson (2-10  $\mu$ l) qui permet une aspiration douce. La chambre où sont transférées les vésicules, est constituée, en bas, d'une lamelle  $22 \times 22 \text{ mm}^2$ , sur laquelle on a greffé des molécules de PEG(5000)(protocole en annexe A.5 p. 170) et en haut d'une lamelle propre. Ce greffage permet de passiver la surface en utilisant la répulsion stérique due aux polymères pour réduire les interactions des vésicules avec la surface et éviter leur adhésion. La recouvrement de la surface contient des défauts qui n'ont pas d'incidence sur les vésicules de tension intermédiaire ( $\sigma \sim 10^{-6} - 10^{-5} \text{ N/m}$ ). Dans le cas de vésicule à très basse tension ( $\sigma \sim 10^{-7} \text{ N/m}$ ) ces défauts provoquent l'adhésion des vésicules par un patch micronique, et induit la formation d'un tube membranaire qui relie le patch à la vésicule, ce qui augmente la tension de la membrane, et change son spectre de fluctuations. Pour effectuer la détection de contours, nous avons choisi des vésicules isolées, qui n'avaient pas de défauts visibles, et qui n'étaient pas attachées à la surface par un tube. La chambre d'observation est construite en assemblant les deux lamelles avec du parafilm, pour obtenir une épaisseur de l'ordre du millimètre.

### Relaxation de la tension

Les étapes d'électroformation et de transfert font que la majorité des vésicules sont trop tendues pour la détection de contours (i.e elles ne fluctuent pas à l'échelle optique). Nous avons déjà vu auparavant que l'évaporation induisait l'augmentation de la concentration de la solution extérieure et donc une diminution de la tension des vésicules grâce à la perméation de l'eau à travers la membrane. Cette méthode était efficace pour les vésicules lipidiques pures. Elle n'a, cependant, pas donné de bon résultats de façon systématique pour les vésicules contenant la BR. Dans certain cas, la tension initiale des vésicules était probablement trop élevée pour être suffisamment réduite par évaporation à des valeurs compatibles avec la détection de contours.

En mettant les vésicules 2 à 3 heures à 4°C, on a remarqué que la majorité des vésicules avaient des fluctuations de forme visibles. On peut expliquer ce phénomène en faisant remarquer que le coefficient de dilatation thermique des lipides est plus élevé que celui de l'eau (tableau ??). Il en résulte que la baisse de température (de 20 à 4 °C) réduit la surface  $S$  de la membrane de façon plus importante que le volume  $V$  de la solution (essentiellement de l'eau) qu'elle entoure. Pour estimer l'influence de la

	coefficient de dilatation thermique $\beta (K^{-1})$
Eau	
5 – 10 °C	$0,53 \cdot 10^{-4}$
10 – 20 °C	$1,50 \cdot 10^{-4}$
20 °C	$2,07 \cdot 10^{-4}$
20 – 40 °C	$3,02 \cdot 10^{-4}$
Lipides	$3,3 \cdot 10^{-3}$

**Tab. 6.1.** *Coefficient de dilatation thermique de l'eau et des membranes lipidiques*

baisse de la température sur le rapport surface/volume, on considère que le coefficient de dilatation de l'eau reste constant à la valeur qu'il a à 20 °C. Ceci revient à surestimer la réduction de volume de la solution due au refroidissement.

$$S^{4^{\circ}\text{C}} = (1 - \beta_{memb} \times 16^{\circ})S^{20^{\circ}\text{C}} \quad \text{avec : } \beta_{memb} = 3,3 \cdot 10^{-3}$$

$$V^{4^{\circ}\text{C}} = (1 - \beta_{eau} \times 16^{\circ})V^{20^{\circ}\text{C}} \quad \text{avec : } \beta_{eau} = 2,1 \cdot 10^{-4}$$

$$\frac{S^{4^{\circ}\text{C}}}{V^{4^{\circ}\text{C}}} = 0,95 \times \frac{S^{20^{\circ}\text{C}}}{V^{20^{\circ}\text{C}}}$$

Le rapport surface/volume diminue de 5% ce qui conduit à une augmentation de la tension. On peut, en effet, considerer que la baisse de température induit essentiellement une réduction de l'excès d'aire disponible  $\alpha$  (de l'ordre de 5%). La variation de l'excès d'aire est reliée à la tension par la relation :

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \exp \left[ \frac{8\pi\kappa}{kT} \cdot (\alpha_0 - \alpha) \right]$$

où  $\sigma_0$  est tension initiale de la vésicule. Pour des membranes dont le module de courbure est de l'ordre de quelques dizaines de kT,  $\frac{\sigma}{\sigma_0} \sim 10^5$ . Sachant que  $\sigma_0 \sim 10^{-7} - 10^{-4}\text{N/m}$ , la diminution de température peut induire une forte augmentation de la tension, qui peut ainsi atteindre la tension d'ouverture de pores (de l'ordre de  $10^{-3}\text{N/m}$ ). Ces pores permettraient la relaxation de la tension par réduction du volume interne de la vésicule. Quand le système est réchauffé de nouveau à température ambiante, la vésicule retrouve l'aire lipidique qu'elle avait au départ, mais celle-ci entoure un volume interne plus faible. On se retrouve, au final, avec des vésicules plus détendues, qui ont des fluctuations visibles au microscope.

L'un des problèmes posés par cette étape de relaxation est que les vésicules ont tendance à toutes se regrouper dans la chambre d'observation, et à se mettre les unes à coté des autres après quelques heures (que ce soit par évaporation ou abaissement de

température). Il est donc difficile de trouver une vésicule isolée, fluctuante, et de taille adaptée.

Nous avons vu que le stockage à 4°C pendant 24 heures endommage les vésicules contenant des lipides PEG. Le fait de les laisser 2 à 3 heures dans le réfrigérateur ne semble pas les affecter autrement que par la réduction de tension que nous venons d'évoquer.

### **Conditions d'illumination des vésicules**

Afin de comparer les spectres de fluctuations actifs et passifs de vésicules contenant la BR, nous devons changer les conditions d'illumination non-actinique - actinique (voir section 4.1.1 du chapitre 4). L'acquisition de spectres actifs se fait en illuminant les vésicules avec de la lumière jaune (actinique). Ceci est fait en insérant un filtre passe haut (en longueur d'onde) avec une longueur d'onde de coupure de 500 nm qui supprime les longueurs d'onde bleues qui perturbent le cycle de pompage de la BR (figure 4.3). On remplace ce filtre jaune par un filtre rouge, passe haut (en longueur d'onde) avec une longueur d'onde de coupure de 665 nm, pour acquérir les spectres passifs. Nous avons vérifié, par des mesures par spectrofluorimétrie (protocole présenté dans la section 4.1.2 p. 80), que la lumière ainsi filtrée n'induisait pas d'activité de pompage, et qu'elle est donc non-actinique.

L'observation des vésicules est faite sur un microscope Zeiss, Axiovert 135, équipée d'une lampe halogène 200 W, et d'un objectif à immersion  $\times 100$ , Plan-APOCHROMAT, d'une ouverture numérique N.A de 1,4. Pour optimiser le contraste de l'image, nous avons utilisé un condenseur à immersion, à forte ouverture numérique (N.A = 1,4). L'acquisition des images a été faite par une caméra numérique PULNIX TM 1040. L'observation est faite en lumière rouge, l'intensité de la source lumineuse étant à 80-90% de son intensité maximale, et le gain de la caméra réglé à 28 dB (réglage enregistré sur la caméra sous le nom de commande ZB). L'illumination jaune, (70% de l'intensité de la lampe halogène, et gain de la caméra réglé à 22 dB, enregistré sous le nom de commande ZA) n'est utilisée que pour acquérir les spectres actifs.

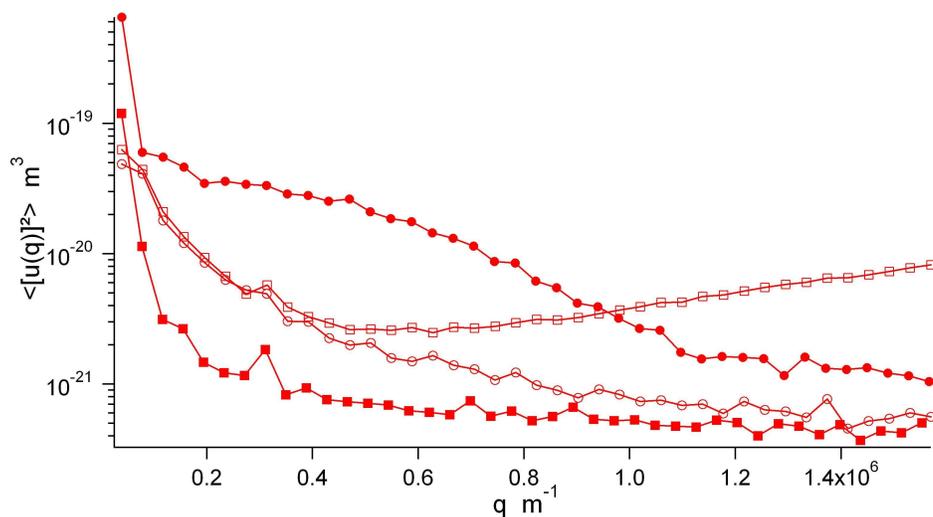
## **6.3.2 Mesure des spectres de fluctuations**

### **Reproductibilité des spectres**

Nous avons vu dans la section 6.2.2 que l'illumination des vésicules contenant de la BR par de la lumière actinique pouvait induire des écarts entre les spectres de fluctuations actifs et passifs. Ces effets allaient, parfois dans le sens d'une amplification des fluctuations, et dans d'autres cas vers une diminution de celles-ci. Jacques Pécréaux avait interprété ces effets comme une compétition entre l'effet hors-équilibre, et celui du potentiel transmembranaire (section 6.2.2). Cependant, il est aussi possible que ces écarts ne soient que des artefacts dus à une mesure non reproductible des spectres.

Pour éclaircir ce point, nous avons entrepris de mesurer systématiquement trois séries de détection de contours successives (de 5000 contours chacune) pour chaque condition d'illumination. Les trois premières détections se faisant dans des conditions d'illumination rouge, elles représentent l'état d'équilibre du système. Les spectres issus de ces détections devraient donc se superposer. Nous avons donc pris comme critère de reproductibilité la superposition de ces trois premiers spectres, et nous ne considérons pour nos analyses que les séries d'expériences qui satisfont ce critère.

Nous avons remarqué que des détections des contours qui semblaient correctes "à l'œil", ne donnaient pas forcément des résultats reproductibles. La figure 6.2 représente quatre spectres acquis, sur une même vésicule, en illumination rouge. Deux spectres ont été acquis successivement (ronds) puis, après une période d'illumination en jaune, deux autres spectres ont été enregistrés à la suite (carrés). On voit clairement que les deux premiers spectres, bien que pris successivement et à priori dans les mêmes conditions, ne se superposent pas, et de même pour les deux suivants. Ces grandes variations sont dues, non pas à des changements des propriétés de la membrane, mais probablement à la méthode de détection qui est très sensible à certains paramètres difficiles à contrôler, comme la mise au point précise de l'image de la vésicule.



**Fig. 6.2.** Spectres de fluctuations acquis, dans des conditions d'illumination non-actinique (rouge), sur une vésicule contenant la BR, et préparée selon le protocole de reconstitution en détergent. Les spectres représentés par des ronds (creux et pleins) ont été acquis avant toute illumination active (jaune), et sont successifs. Les spectres représentés par des carrés (creux et pleins) ont été acquis après une période d'illumination active (jaune), et sont aussi successifs.

Nous écarterons donc systématiquement les séries d'expériences où les trois premiers

spectres acquis en lumière non-actinique ne se superposent pas, car on ne peut plus conclure sur l'effet de l'activité. La difficulté de ces mesures est de distinguer les vrais effets hors équilibres des artefacts de la détection.

Dans le but de vérifier l'existence des effets hors-équilibre, et du potentiel transmembranaire, nous avons effectué des détections de contours en alternant les conditions d'illumination rouge (passif) et jaune (actif), au moins deux fois. Pour s'assurer de la reproductibilité de la détection, nous avons acquis trois spectres successifs (de 5000 contours) dans chaque condition d'illumination. La durée d'une détection de 5000 spectres était de l'ordre de 5 minutes. La détection peut être perturbée par la présence d'autres vésicules, ou d'autres objets en suspension passant à proximité. Dans ce cas, les contours ne sont retenus que s'ils ne sont perturbés que pour de courtes durées (dizaines de secondes). Pour des perturbations de plus longue durée, nous avons soit refait la détection lorsque la vésicule s'éloignait de nouveau de l'élément perturbateur, soit abandonné dans les cas contraires. Du fait de ces aléas, tous les spectres d'une même série de mesures ne sont pas forcément exploitables. Nous ne considérons dans nos analyses que les séries où on avait au moins deux spectres passifs successifs, et deux spectres actifs successifs.

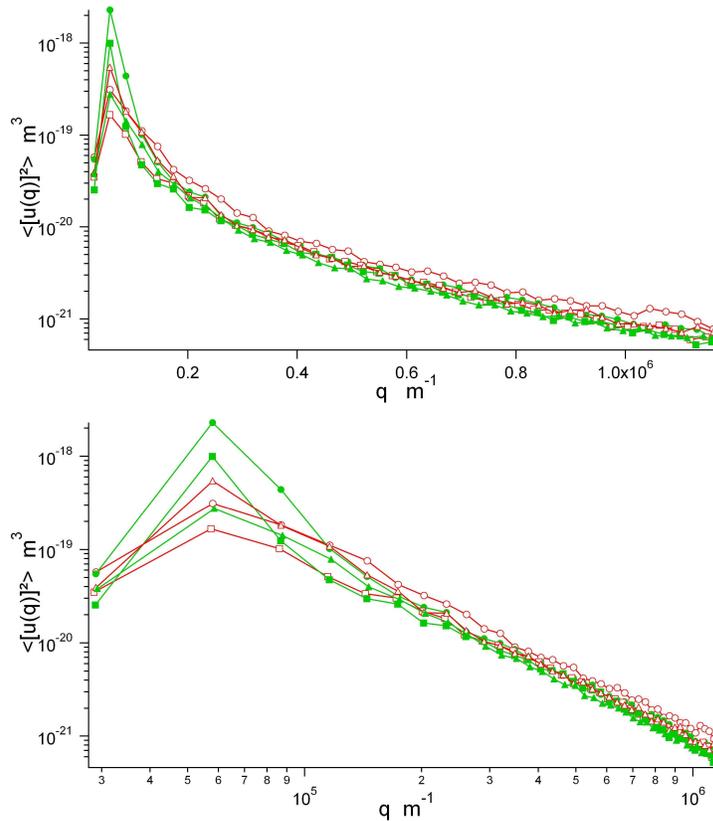
### Effet de l'activité protéique

Avec la méthode de reconstitution de la BR décrite ci-dessus, quand on ne considère que les séries de détections où les trois premiers spectres passifs sont superposables, les spectres suivants (actifs et passifs) viennent aussi se superposer aux trois premiers. Comme on peut le voir dans les figures 6.3, il n'y a pas de différences entre les spectres actifs et passifs, notamment dans la région des grands vecteurs d'onde où l'on s'attend à voir une amplification significative des fluctuations. On ne voit donc aucun effet dû à l'activité protéique sur les spectres de fluctuations, ce qui est très surprenant.

Par ailleurs, la quantification des propriétés de ces membranes par la procédure de fit prenant en compte le temps d'intégration  $\tau = 33\text{ ms}$  n'a pas été concluante. En effet la procédure de fit ne pouvait pas décrire correctement les courbes expérimentales, et donnait dans un grand nombre de cas un message d'erreur, tant pour les courbes actives que pour passives. Ceci s'explique par la forme des spectres mesurés qui sont linéaires en échelle logarithmique (voir chapitre 5 figure 5.13 p. 117). La fonction de fit, qui n'est pas linéaire dans cette gamme de vecteurs d'onde en échelle logarithmique, ne permet pas de décrire ces spectres. Ceci pourrait être relié, comme nous l'avons vu dans le chapitre 5, à l'effet de la pesanteur qui déforme les grandes vésicules et perturbe le spectre de fluctuations. En effet, les vésicules sur lesquelles la détection de contours avait donné des résultats probants avaient un diamètre compris entre 60 et 70  $\mu\text{m}$ . Dans les cas où la procédure de fit réussit pourtant à converger, elle donne des valeurs du module de courbure  $\kappa \simeq 10^{-19}\text{ J}$  nettement supérieures à la valeurs attendue pour ces membranes  $4.10^{-20}\text{ J}$  [Manneville, 1999, Manneville *et al.*, 2001], la présence de 5% en masse de

lipides PEG n'augmentant que faiblement cette valeur ( $+ 10^{-20} J$ ) [Cuvelier, 2005].

**Conclusion :** l'activité des protéines n'induit pas de différences mesurables par détection de contours, au niveau de l'amplitude ou de la forme des spectres de fluctuations.

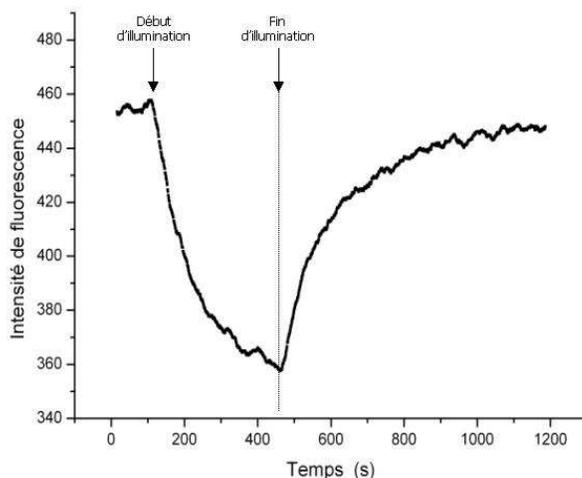


**Fig. 6.3.** Spectres de fluctuations acquis sur une vésicule contenant la BR et préparée selon le protocole de reconstitution en détergent, en échelles semi-logarithmique (haut), et logarithmique (bas). Les courbes rouges (et symboles creux) correspondent à des spectres acquis successivement sous une illumination non-actinique (rouge). Les courbes vertes (et symboles pleins) correspondent à des spectres acquis successivement sous une illumination actinique (jaune).

## 6.4 Expériences de contrôle

### 6.4.1 Vérification de l'activité protéique

La première expérience de contrôle consiste à vérifier que la protéine est fonctionnelle dans nos conditions expérimentales. Nous avons testé l'activité de la BR par la méthode fluorimétrique présentée dans la section 4.1.2 p. 80.



**Fig. 6.4.** Evolution de la fluorescence de la 9-AminoAcridine (9AA), présente dans le milieu extérieur d'une solution de protéoliposomes contenant la BR, en fonction des conditions d'illumination (noir - actinique - noir). La première flèche indique le début de l'illumination actinique, la seconde son extinction.

La reconstitution de la BR grâce au Triton X permet l'insertion de la protéine préférentiellement dans une direction dans les LUV (Large Unilamellar Vesicles) induisant un pompage des protons principalement vers l'intérieur. L'activité de pompage induit donc une augmentation du pH du milieu extérieur. En ajoutant la 9-AminoAcridine (9AA) dans la solution extérieure, on peut suivre cette augmentation du pH en utilisant un spectrofluorimètre. Nous avons conduit ces tests sur les LUVs en utilisant les solutions utilisées, pour la préparation des GUVs, dans les expériences de détection de contours et les mêmes filtres pour l'éclairage. Comme on peut le voir sur la figure 6.4 l'activation de la protéine par illumination avec une lumière actinique induit une baisse de la fluorescence de la 9AA. L'arrêt de l'illumination induit la relaxation de cette fluorescence à son niveau initial. Ce test prouve que la protéine est active à la fin du protocole de reconstitution. [Girard *et al.*, 2004a] ont montré que le protocole d'électro-

formation que nous avons utilisé préserve aussi l'activité protéique (en particulier pour la BR qui est une protéine connue pour sa robustesse).

**Conclusion : La protéine est active et capable de pomper dans les conditions expérimentales utilisées.**

### 6.4.2 Le potentiel transmembranaire

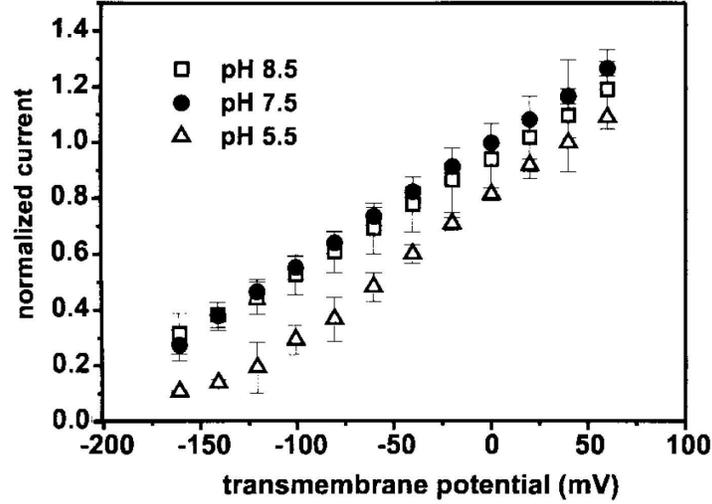
Les expériences de détection de contours ont montré qu'il n'y a pas de différences entre les spectres acquis dans des conditions d'activation des protéines, et ceux où les protéines sont inactives. Pourtant, la protéine est fonctionnelle, et est capable de créer des gradients à travers la membrane (section 6.4.1). Mais sachant que ces potentiels peuvent inhiber l'activité protéique, est-il possible que cette absence d'amplification des fluctuations soit due à un tel effet ?

Un argument qui va à l'encontre de cette hypothèse est que tous les spectres actifs se superposent aux trois premiers spectres passifs. En effet ces trois premiers spectres représentent l'état d'équilibre du système où il n'existe aucun gradient de part et d'autre de la membrane car il n'y a pas eu de pompage. La présence d'un gradient induirait des changements des propriétés physiques de la membrane (notamment  $\kappa$ ) [Ambjornsson *et al.*, 2007], donc des changements des spectres de fluctuations suite à l'activation des protéines, même si celles-ci ne pompent plus. Un tel effet n'a pas été observé dans nos expériences.

De plus, une dissymétrie dans l'orientation des protéines ne conduit pas à une augmentation monotone du potentiel transmembranaire jusqu'au potentiel d'inhibition des pompes. En effet, [Geibel *et al.*, 2001] ont effectué des mesures de patch clamp sur des BR exprimées dans des cellules oocytes de *Xenopus laevis*, et ont montré qu'une différence de potentiel opposée au sens du transport réduit l'activité de la protéine, par contre, une différence de potentiel dans le sens du transport augmente l'activité, et ceci de façon linéaire sur la plage de différence de potentiels étudiés (-160 mV à +60 mV).

Lorsqu'on a une dissymétrie entre les pompes  $\uparrow$  et  $\downarrow$ , la population majoritaire impose une différence de potentiel qui réduit son activité, et favorise l'activité de la population minoritaire. Si on appelle :

- $j$  : le courant induit par l'activité d'une protéine en l'absence de potentiel transmembranaire.
- $\omega$  : taux de réduction de l'activité par unité de potentiel transmembranaire.
- $n$  : densité de protéines dans les deux orientation  $n_{\uparrow} + n_{\downarrow}$ .
- $\Delta n$  : différence de densité entre les deux orientation  $n_{\uparrow} - n_{\downarrow}$ .
- $\Delta\phi$  : potentiel transmembranaire.



**Fig. 6.5.** Evolution du courant induit par le pompage de la BR en fonction du potentiel transmembranaire, mesuré par patch-clamp. Le courant est normalisé par sa valeur pour un potentiel transmembranaire nul (0 mV), et un pH=7,5. Les trois courbes correspondent à trois conditions de pH différentes : 5,5 ; 7,5 ; et 8,5. [Geibel et al., 2001]

Les courants induits par chacune des deux populations sont donnés par :

$$J_{\uparrow} = \frac{n + \Delta n}{2} \times (1 - \omega \Delta \phi) j \quad (6.2)$$

$$J_{\downarrow} = \frac{n - \Delta n}{2} \times (1 + \omega \Delta \phi) j \quad (6.3)$$

Si on néglige le courant de fuite à travers la membrane, l'état stationnaire est atteint pour  $J_{\uparrow} = J_{\downarrow}$ , quand la différence d'activité compense le déséquilibre entre les deux populations d'orientation. Cette égalité donne :

$$\Delta \phi = \omega^{-1} \frac{\Delta n}{n} \quad (6.4)$$

Le comportement linéaire du courant en fonction du potentiel transmembranaire représenté dans la figure 6.5 donne  $\omega = 5 V^{-1}$  [Geibel et al., 2001]. Pour cette valeur, une différence de population de 50% induit une différence de potentiel de 100 mV. Sachant que l'on néglige la perméation passive à travers la membrane, cette valeur surestime la valeur de ce potentiel. En tous cas, comme on peut le voir sur la courbe 6.5, un potentiel transmembranaire de 100 mV réduit mais n'inhibe pas l'activité de pompage de la BR. De plus, le protocole de préparation utilisé (reconstitution en détergent +

électroformation) donne une distribution de protéine proche de la symétrie ( $\Delta n \rightarrow 0$ ) [Girard *et al.*, 2004a].

**Conclusion : L'absence d'amplification active des fluctuations, mesurable par détection de contours, n'est pas due à une inhibition de l'activité de pompage de la BR par un potentiel transmembranaire.**

### 6.4.3 Expériences de micropipettes

Les expériences de reconnaissance de contours sur le système de vésicules contenant la BR ont montré l'absence d'effet hors-équilibre notable dans la gamme de vecteurs d'onde accessibles à notre montage expérimental. Une explication de cet état de fait serait que la gamme de vecteurs d'onde accessibles n'est pas suffisante pour distinguer cet effet, si celui-ci domine principalement aux grands vecteurs d'onde. Pour répondre à cette question, nous avons conduit des expériences de micro-pipettes, similaires à celles de J.B. Manneville, mais en utilisant les mêmes protocoles de préparation de vésicules et buffers que ceux utilisés précédemment. Nous présenterons dans cette section ces expériences, et leurs résultats.

#### Préparation des vésicules, et des micropipettes

Le but des expériences de micropipettes étant de comparer ces mesures avec de nos expériences d'analyse de contours, nous avons utilisé les mêmes protocoles de fabrication des protéoliposomes géants, de transfert, et de relaxation de la tension que ceux utilisés pour les expériences de détection de contours (section 6.3.1 p. 127). Nous n'avons pas incorporé de lipides PEG dans la composition lipidique des membranes.

Les micropipettes, ont été fabriquées, à partir de capillaires en verre de diamètre interne  $\phi = 1 \text{ mm}$ , en utilisant une étireuse automatique (P-97, Sutter Instruments Co.). Leurs bouts ont été coupés, de façon contrôlée à l'aide d'une microforge, pour obtenir un diamètre de  $3 - 5 \mu\text{m}$ . Pour éviter l'adhésion des vésicules dans la pipette, nous l'avons traitée avec une solution de caséine. Nous l'avons d'abord incubée, pendant 1h, dans une solution filtrée contenant de la caséine à  $25 \text{ mg/ml}$ , solubilisée dans le tampon utilisé pour le transfert des vésicules, rincé ensuite avec ce même buffer de transfert. Cependant, les pipettes étaient parfois bouchées par des agrégats qui se formaient à cause de la haute concentration de caséine. Pour éviter cela, nous avons rempli la pipette avec une solution de caséine à  $5 \text{ mg/ml}$ , solubilisée également dans le tampon de transfert, et nous en avons incubé le bout directement dans la chambre de transfert pendant une demi-heure.

### Méthodes d'observation, de micromanipulation, et d'analyse d'image

Nous avons observé les vésicules sur un microscope inversé (Zeiss, Axiovert 135), équipé d'un objectif à immersion  $\times 100$  Plan-Apochromat (NA=1,4). Nous avons utilisé la technique de contraste interférentiel différentiel (DIC), qui permet une bonne observation de la langue de membrane aspirée dans la pipette. C'est une technique qui mesure le gradient de l'indice optique, et qui est donc sensible au saut d'indice au niveau de la membrane.

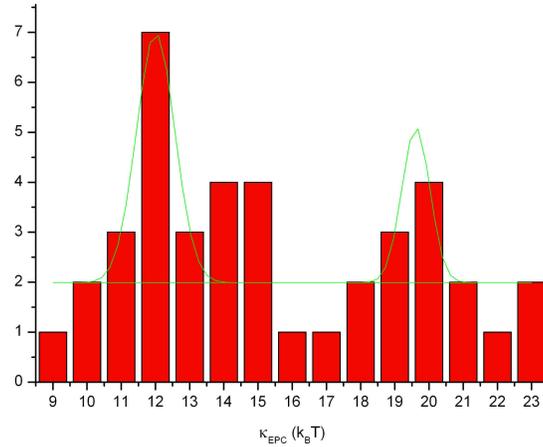
Pour contrôler la pression d'aspiration dans la pipette, celle-ci est reliée à un réservoir d'eau de hauteur variable, qui impose la pression, et que l'on peut déplacer verticalement grâce à une vis micrométrique. La pression imposée est mesurée par rapport à une référence fixe, par un transducteur de pression (Validyne, Northridge, CA). Le réservoir et la référence sont équilibrés avant chaque mesure.

Nous avons choisi des vésicules qui avaient une tension suffisamment basse pour avoir une "langue" visible aspirée dans la pipette pour des dénivelés d'eau de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu m$ . Elles sont, cependant, moins fluctuantes que les vésicules utilisées pour la détection de contours. Avant d'effectuer la mesure, nous avons fortement aspiré la vésicule dans la pipette pour relaxer l'excès d'aire qui pourrait être emmagasiné dans des structures lipidiques non résolues au microscope. L'observation des vésicules et la première mesure sont faites en condition d'illumination rouge (non-actinique), la seconde mesure sur la même vésicule, sous une illumination jaune (actinique). La mesure consiste en une augmentation par paliers de la pression d'aspiration. Chaque augmentation est suivie d'environ 20 secondes de temps d'attente, puis l'enregistrement d'une image de la langue aspirée dans la pipette. Pour éviter l'évaporation, nous avons fermé la chambre d'observation avec de l'huile minérale.

La mesure de la taille de la langue se fait par analyse des images avec le logiciel ImageJ. Nous avons tracé, pour chaque image, le profil de niveau de gris le long du milieu de la pipette, qui présentait un minimum au niveau de la membrane. La grandeur pertinente pour cette expérience est la variation de la taille de la langue par rapport à un état référence. Nous avons donc mesuré la taille de la langue en prenant, comme origine, un point arbitraire fixe de la pipette (au niveau du bout). Nous avons vu dans 4.2 que, dans le régime entropique, la tension  $\sigma$  est reliée à la variation de l'excès d'aire  $\Delta\alpha$  par la relation :

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right) \quad (6.5)$$

En traçant le logarithme du rapport  $\frac{\sigma}{\sigma_0}$  en fonction de la variation de l'excès d'aire, on obtient une droite dont la pente est le rapport  $\frac{8\pi\kappa}{k_B T}$ , que l'on mesure par une procédure de fit linéaire.



**Fig. 6.6.** Bilan des mesures du module de courbure  $\kappa$  par micropipettes pour des vésicules EPC.

#### 6.4.4 Résultats : EPC et BR reconstituée dans EPC

Nous avons d’abord entrepris de mesurer les propriétés physiques d’une composition connue. La figure 6.6 résume les résultats de la mesure du module de courbure  $\kappa$  de vésicules EPC électroformées. On remarque que la distribution est très large (large gamme de valeurs de  $\kappa$ ), avec deux maxima. Le fit par une double gaussienne montre que le premier pic se situe à  $12 k_B T$ , tandis que le deuxième est à  $19,6 k_B T$ .

La présence de ce deuxième pic était inattendue car la méthode d’électroformation donne une majorité de vésicules unilamellaires [Mathivet *et al.*, 1996]. Le module de courbure du mélange EPC, donné dans la littérature est cependant bien de l’ordre de  $12 k_B T$  (tableau 2.1 p. 50).

Le deuxième pic présent dans cette distribution pourrait s’expliquer par la présence d’une population de vésicules bilamellaires. Généralement les vésicules EPC obtenues par électroformation sont unilamellaires. Pour vérifier ce point, nous avons conduit des expériences de cytométrie de flux FACS [Fluorescence Activated Cell Sorting] sur des vésicules fluorescentes. Le principe du FACS consiste à envoyer les vésicules dans un capillaire très fin. Chaque vésicule individuelle passe devant un faisceau laser, et l’instrument enregistre la fluorescence de la vésicule ainsi que l’intensité de lumière diffusée (reliée à la taille de la vésicule). Cette technique est très utilisée pour les études sur des cellules. Son avantage majeur est qu’elle permet d’étudier un très grand nombre de vésicule en très peu de temps (typiquement de plusieurs centaines à des milliers de vésicules par minute). Pour vérifier la distribution de fluorescence dans notre

distribution de GUVs, nous avons étudié d'abord, avec l'aide de Marie Lamblet au laboratoire, un échantillon contenant deux populations de vésicules de façon à calibrer le système : une première population de vésicules EPC contenant 1% en masse de Bodipy-FL (marqueur fluorescent), et une seconde constituée de vésicules EPC contenant 2% de Bodipy-FL (soit deux fois plus que la première). Quand on trace, pour toutes les vésicules testées, l'intensité de fluorescence en fonction de l'intensité lumineuse diffusée, on obtient deux bandes de points séparées. On en conclut que cette méthode permet de distinguer les deux populations. Cependant, l'étude des vésicules utilisées pour nos expériences (marquées avec du Bodipy-FL) ne montre qu'une seule bande. On en conclut que la majorité de ces vésicules sont unilamellaires.

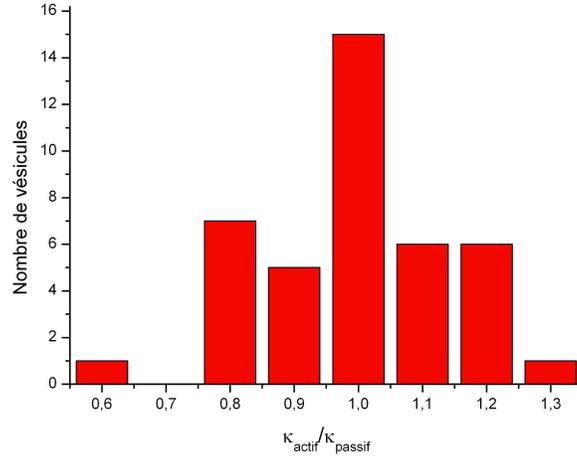
Une explication possible des résultats des mesures par micropipettes pourrait être que sur la population de vésicules que nous choisissons pour nos expériences (basse tension) les vésicules bilamellaires soient surreprésentées. Malheureusement nous n'avons pas pu faire de mesures de FACS concluantes sur les vésicules après relaxation de la tension à 4° probablement à cause de la fragilité des vésicules à ces valeurs de la tension.

Une autre possibilité serait que cette large distribution des valeurs de  $\kappa$  soit due aux interactions de la membrane avec la pipette malgré le traitement à la caséine. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir une distribution de valeurs de  $\kappa$  plus étroite malgré nos efforts.

Pour étudier l'effet de l'activité de la BR et comparer nos résultats à ceux de J.B. Manneville (voir section 4.3 p. 85), nous avons effectué, pour chaque vésicule contenant la BR, des mesures par micropipette en illumination non-actinique, puis en illumination actinique. En effet, si les valeurs mesurées sont différentes, à cause de la large distribution obtenue pour les valeurs de  $\kappa$ , on ne pourrait pas conclure que cette différence est due à l'activité. Cependant, si les valeurs de  $\kappa$  mesurées pour chaque vésicule sont similaires avec une illumination actinique et non-actinique, on peut conclure que les effets actifs sont notablement plus faible que ceux mesurés par J.B. Manneville. En effet, les résultats de ce dernier peuvent être interprétés comme une réduction par un facteur 2 du module de courbure pour les membranes actives par rapport au cas passif.

Pour vérifier la présence des effets actifs, nous avons donc mesurer le rapport  $\kappa_{actif}/\kappa_{passif}$  pour chaque vésicule (Figure 6.7). On remarque que la distribution des valeurs de ce rapport est centrée sur 1, ce qui indique l'absence d'effet de l'activité. Les résultats de J.B. Manneville nous faisaient attendre une distribution pour ce rapport centrée sur 0,5 (équivalent à une température effective  $T_{eff} = 2 \times T$ ). Les mesures de micropipettes montrent donc que les effets actifs observés par J.B. Manneville ne sont pas présents pour les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

**Conclusion : L'absence d'effet actif observée dans les mesures de spectres de fluctuations n'est pas due à un manque de sensibilité de la technique de détection de contours, mais probablement au protocole de préparation des GUVs.**



**Fig. 6.7.** Histogramme des valeurs du rapport  $\frac{\kappa_{\text{actif}}}{\kappa_{\text{passif}}}$  pour des vésicules contenant la BR.  $\kappa_{\text{actif}}$  est le module de courbure mesuré sous illumination actinique, et  $\kappa_{\text{passif}}$  est celui mesuré sous illumination non-actinique.

### 6.4.5 Méthode de reconstitution

Nous avons vu dans les sections précédentes que les effets hors-équilibre, observés par J.B. Manneville, sont absents dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Nous allons décrire dans cette section les différences entre notre protocole et celui utilisé par J.B. Manneville.

#### Comparaison des protocoles de préparation des membranes actives

Le protocole de reconstitution de la BR utilisé par J. B. Manneville (voir 4.1.2 p. 79) consistait à solubiliser les lipides et les protéines ensemble dans l'éther et de déposer le mélange sous la forme d'un film sur une lame ITO (protocole en annexe A.3 p. 167). L'électroformation était faite dans une solution de sucrose contenant 1 mM d'azide de sodium. Les vésicules étaient ensuite transférées dans une solution de glucose également à 50 mM et contenant 1 mM d'azide de sodium. Ce dernier était utilisé pour empêcher la prolifération de bactéries dans les solutions de sucrose et de glucose. La protéine était marquée par la molécule fluorescente FITC. L'observation des vésicules en fluorescence avait montré que la répartition de la BR était inhomogène dans les vésicules [Manneville, 1999]. La solubilisation des cristaux de BR n'était donc pas complète, ce qui avait justifié la mise au point d'un nouveau protocole de reconstitution [Girard *et al.*, 2004a].

Le protocole utilisé pour les expériences présentées jusqu'à présent dans ce chapitre

est basé sur la reconstitution des protéines en petits liposomes à l'aide de détergent. Cette méthode (présentée 4.1.2 p. 79) permet d'avoir une incorporation homogène des protéines dans les vésicules. Les solutions aqueuses utilisées correspondent à des conditions où l'activité de la BR a été vérifiée par mesures en spectrofluorescence (section 6.4.1 p. 134). Il est à noter que ces solutions ne contenaient pas d'azide de sodium.

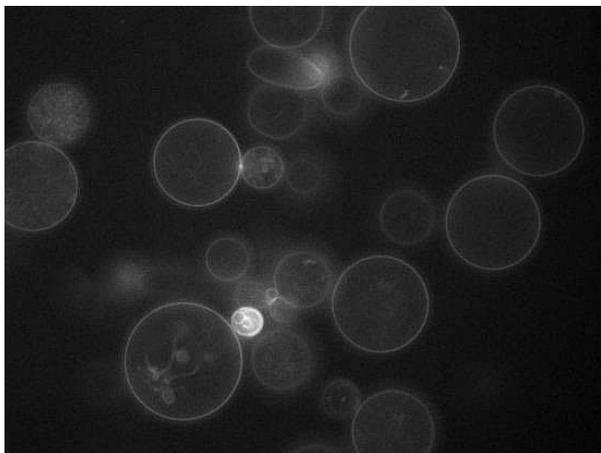
On conclut de cette comparaison que les différences majeures entre ces deux protocoles sont :

- la présence de cristaux de BR.
- La présence de l'azide de sodium dans les solutions d'électroformation et de transfert.

Nous allons présenter dans la suite de cette section les résultats de nos expériences sur des vésicules actives préparées selon le protocole de reconstitution utilisé par J.B. Manneville.

### **Cristaux de BR dans les GUVs**

Pour étudier l'influence de la présence de cristaux de BR dans la membrane sur ses propriétés physiques et notamment les effets hors équilibre, nous avons utilisé le même protocole de préparation des GUVs actives que celui utilisé par J.B. Manneville. En effet, il est possible que l'organisation en une structure cristalline augmente l'activité protéique. Ainsi, l'amplitude de l'amplification des fluctuations mesurée par Manneville, pourrait être en partie due aux cristaux, absents dans le protocole utilisant un détergent. Il se pourrait donc que, sans les cristaux, cette amplification soit trop faible pour être mesurable.



**Fig. 6.8.** *Vésicules contenant de la BR marquée avec la molécule fluorescente Alexa 488. Ces vésicules ont été préparées, selon le protocole utilisé par J.B. Manneville, par solubilisation dans l'éther (protocole en annexe A.3 p. 167).*

La reproduction du protocole utilisé par Manneville avec des protéines marquées avec la molécule FITC ou Alexa 488, a toujours donné des vésicules homogènes sans patches très fluorescents qui indiqueraient la présence de cristaux (figure 6.8), même quand on supprimait l'étape de sonication des protéines et des lipides dans l'éther. Cette différence pourrait venir du fait qu'on a utilisé des membranes pourpres provenant d'un laboratoire différent (Oesterhelt, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried) de celui qui avait fourni J.B. Manneville (J.L. Rigaud, Institut Curie), et purifiée selon des protocoles différents. Nous n'avons pas trouvé de protéines purifiées dans des conditions similaires à celles utilisées par Manneville pour vérifier cette hypothèse.

Les expériences de détection de contours réalisées sur des vésicules préparées selon ce protocole, et observées en utilisant les mêmes solutions d'électroformation et de transfert que les expériences de contour précédentes, n'ont pas montré de différences entre les conditions d'illumination actinique et non-actinique. Ceci montre que les conditions de reconstitution ne sont pas à l'origine des différences entre les expériences de J.B. Manneville et les nôtres.

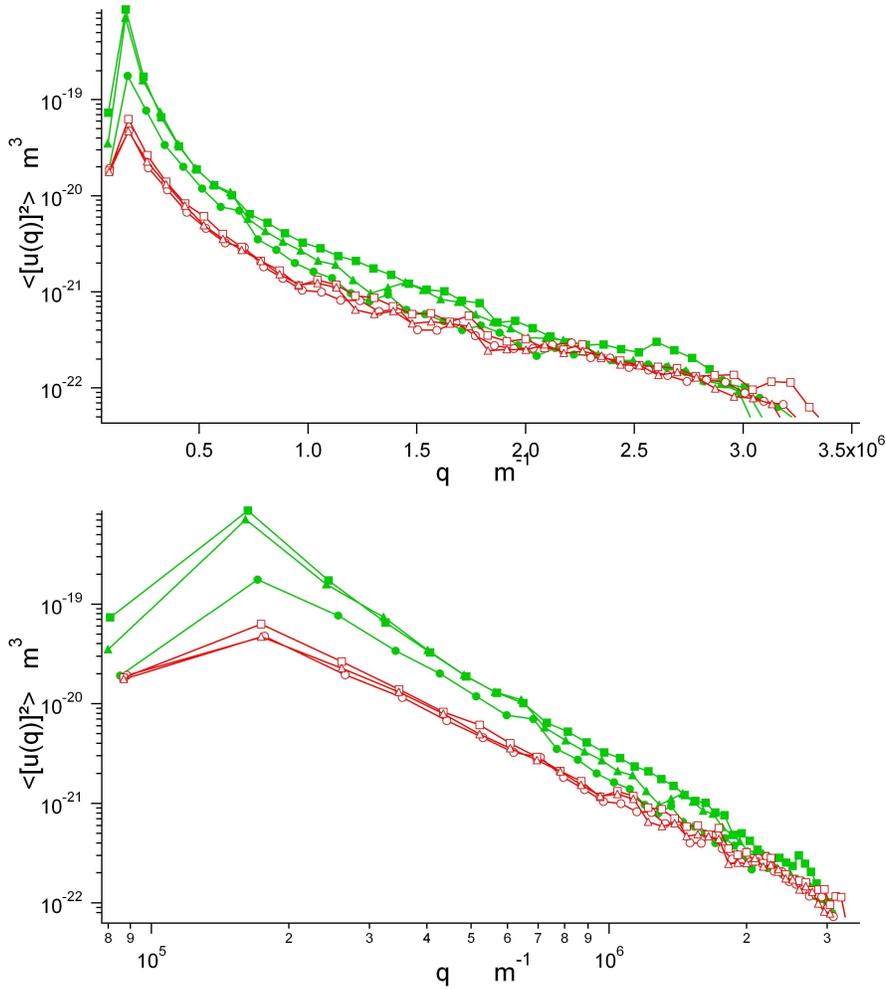
**Conclusion : Les effets hors-équilibres ne sont pas présents dans les vésicules actives préparées selon le protocole de reconstitution utilisé par J.B. Manneville (sans ajout d'azide de sodium).**

#### 6.4.6 L'azide de sodium

Pour conclure la comparaison entre nos expériences et celles de J.B. Manneville, nous avons entrepris d'utiliser exactement les mêmes conditions. Nous avons repris le même protocole de reconstitution (par solubilisation dans l'éther), en électroformant les vésicules dans une solution contenant 50mM sucrose et 1 mM d'azide de sodium. Les GUVs ont, ensuite, été transférées dans une solution de glucose à 50 mM contenant 1 mM d'azide de sodium. Dans ces conditions (identiques à celles de J.B. Manneville), nous avons observé des différences significatives entre les spectres mesurés en illumination non-actinique et ceux mesurés en illumination actinique (spectres de la figure 6.9). L'activité protéique a induit, dans ces conditions, l'apparition d'une amplification nette des premiers modes de fluctuations des vésicules. Nous concluons de ces résultats que la présence de l'azide de sodium est nécessaire à l'apparition d'effets actifs mesurables. Nous allons consacrer la section suivante à l'analyse de cette amplification active des fluctuations. Nous discuterons dans ce qui suit l'effet de l'azide de sodium sur l'activité de la BR.

L'azide de sodium  $NaN_3$  est une molécule toxique utilisée en biologie comme biocide. Elle empêche donc la prolifération des bactéries. C'est pour cette raison que J.B. Manneville en utilisait dans ces solutions d'électroformation, et de transfert.

L'effet majeur connu de l'azide de sodium sur la BR est la restitution de l'activité de transport au mutant Asp96Asn qui est "inactif" en conditions normales comme le

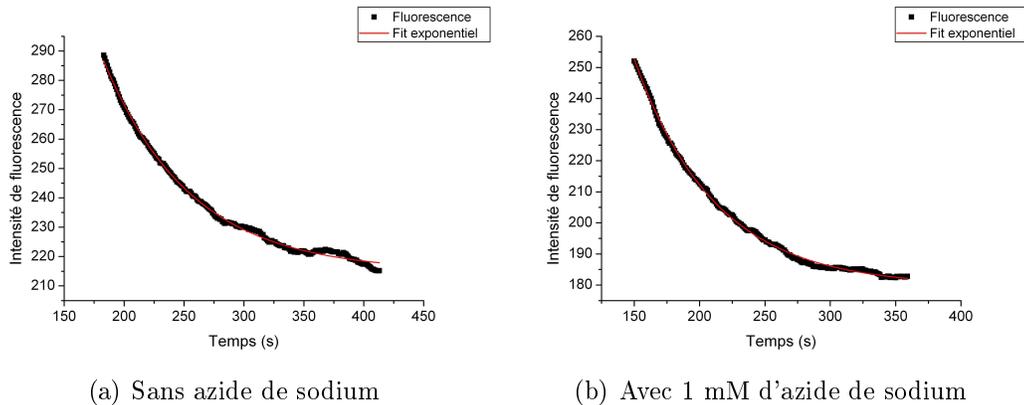


**Fig. 6.9.** Spectres de fluctuations d'une vésicule contenant la BR en présence de 1 mM d'azide de sodium. Les courbes rouges (symboles creux) correspondent aux spectres passifs, les courbes vertes (symboles pleins) aux spectres actifs (haut : échelle semi-logarithmique, bas : échelle logarithmique).

montre l'étude présentée dans [Tittor *et al.*, 1989]. Le remplacement de l'aspartate à la position 96 par un asparagine, augmente de façon significative le temps de vie de plusieurs états intermédiaires du photocycle, en particulier l'état M qui est l'état de durée de vie la plus longue. La mutation augmente cette durée de vie par un facteur 100 (de 5 ms à 500 ms). L'aspartate à la position 96 (un des acides aminés les plus acides  $pH_i = 2,98$ ) joue un rôle majeur dans le transport du proton, en particulier la reprotonation de la base de Schiff. Son remplacement par l'asparagine ou la glycine (moins acide) ralentit sensiblement ce processus. L'hydrolyse de l'azide de sodium dans

l'eau conduit à la formation de l'acide azothydrique ( $HN_3$ ), un acide faible, qui facilite la reprotonation (temps de vie de l'intermédiaire M réduit à 1 ms), jusqu'à la rendre plus rapide que dans la protéine sauvage. Les auteurs de cette étude n'ont relevé aucun effet de l'azide sur la protéine normale.

[Ormos *et al.*, 1997] ont étudié l'effet de l'azide de sodium sur l'activité de la BR sauvage. Ils ont montré que l'acide azothydrique modifie les temps de vie de plusieurs intermédiaire du photocycle, et en particulier la reprotonation de la base Schiff, mais dans une moindre mesure que pour le mutant Asp96Asn. La transition entre l'état M et N est accélérée de manière significative pour de fortes concentrations d'azide ( $\simeq 100\text{ mM}$ ), par rapport au cas avec une faible concentration d'azide. D'autre part, [Steinhoff *et al.*, 1999] ont effectué des mesures de résonance paramagnétique électronique sur la BR en présence de l'azide. En utilisant des marquages "nitrospin" (marqueur sensible à la polarité de son environnement) à différentes positions dans la BR, il ont montré que les barrières hydrophobes dans le canal transportant le proton sont réduites par l'ajout de 100 mM d'azide.



**Fig. 6.10.** Evolution de l'intensité de fluorescence de 9-aminoacridine en fonction du temps, lors du test de l'activité de la BR en protéoliposomes (voir section 6.4.1). La courbe rouge correspond à un fit monoexponentiel : (a) Test d'activité en absence d'azide de sodium. La décroissance a un temps caractéristique de  $72,4 \pm 0,8\text{ s}$ . (b) Test d'activité en présence d'azide de sodium (1mM). La décroissance a un temps caractéristique de  $61,9 \pm 0,5\text{ s}$ .

Nous n'avons cependant pas trouvé d'étude comparative correspondant à nos conditions expérimentales (1 mM d'azide de sodium). Nous avons donc conduit des tests d'activité à l'aide d'un spectrofluorimètre en utilisant la sonde à pH 9-AminoAcridine (voir section 6.4.1 p. 134). Nous avons mesuré le temps caractéristique de la décroissance exponentielle de la fluorescence lors de l'activation des protéines. En absence d'azide, ce temps caractéristique est de l'ordre de 72 s ( $\pm 1$ ). L'ajout de l'azide de sodium (à 1

et 2 mM) diminue ce temps caractéristique à 62 s ( $\pm 1$ ), ce qui est cohérent avec une accélération de l'activité de pompage de la protéine (figure 6.10). Néanmoins, ces effets apparaissent faibles par rapport à la forte amplification des fluctuations due à l'activité de la BR en présence de l'azide de sodium.

**Conclusion :** En présence de l'azide de sodium, l'activité de pompage de la BR induit une amplification de l'amplitude des fluctuations de la membrane particulièrement visible pour les petits vecteurs d'ondes.

## 6.5 Quantification des effets actifs et comparaison aux modélisations théoriques

Nous avons vu dans la section précédente que l'activité protéique induit une amplification des fluctuations aux petits vecteurs d'onde (en présence de l'azide de sodium), ce qui irait dans le sens d'une diminution active de la tension membranaire. Nous allons consacrer cette section à la caractérisation de ces effets et leur confrontation aux théories existantes.

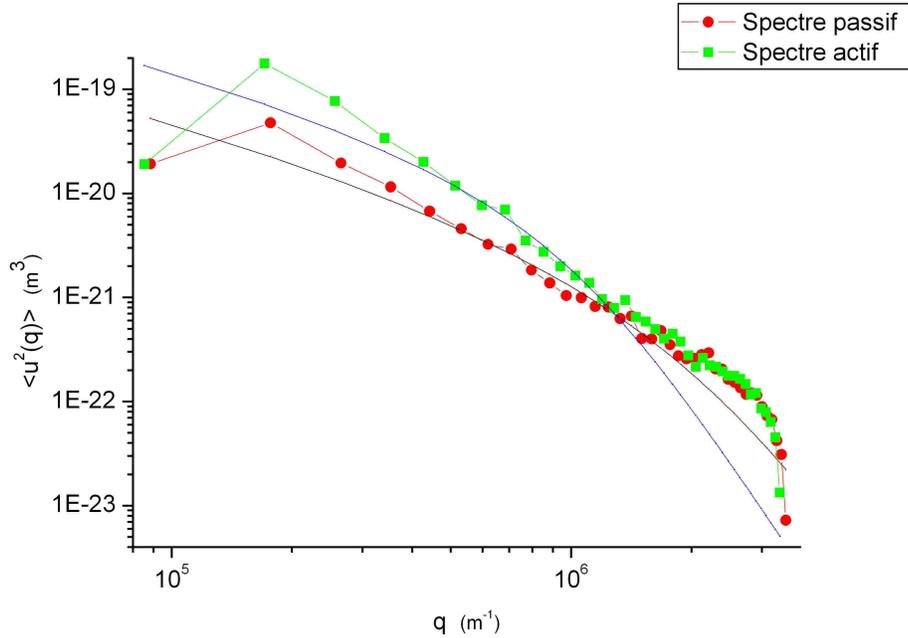
### 6.5.1 Membranes EPC contenant la BR : état passif

Pour caractériser les propriétés physiques des membranes EPC contenant la BR, nous avons utilisé la procédure de fit exposée dans la chapitre 5 (prenant en compte le temps d'intégration) section 5.3.3 p. 106. Cette procédure permet une bonne mesure de la tension membranaire, mais semblait surestimer systématiquement le module de courbure probablement à cause de la grande taille des vésicules utilisées dans les expériences sur les membranes purement lipidiques. Pour les vésicules EPC contenant la BR, préparée comme décrit ci-dessus, les valeurs du module de courbure mesurées par cette procédure de fit sur les spectres passifs (figure 6.11), sur des vésicules de taille inférieure à 20  $\mu m$ , sont similaires à celles mesurée par J.B. Manneville par micropipettes ( $4 \cdot 10^{-20} J$ ) [Manneville, 1999], bien que la distribution des valeurs soit large (Tableau C.4 p. 181). Pour les spectres passifs (rouge) de la figure 6.9, par exemple, la valeur de  $\kappa$  varie de 5 à  $7 \cdot 10^{-20} J$ . Notons que les vésicules utilisées dans ces expériences avaient un rayon allant de 10 à 20  $\mu m$ . On retrouve également des valeurs très élevées de  $\kappa$  pour les vésicules d'un rayon supérieur à 25  $\mu m$ . Ces spectres n'ont pas été utilisés dans les analyses que nous allons détailler dans la suite de ce chapitre.

### 6.5.2 Caractérisation des effets actifs

Pour caractériser les spectres actifs, nous avons adapté avec l'aide de J. Pécréaux la procédure de fit pour prendre en compte les termes actifs prévus par la théorie RTP

(équation 6.1). Malheureusement cette procédure de fit ne convergeait pas correctement, et donnait systématiquement un message d'erreur. Ce comportement s'explique par la différence de forme marquée, entre les courbes expérimentales (linéaires en échelle logarithmique) et la fonction de fit qui ne présente pas le même comportement (figure 6.11).



**Fig. 6.11.** Fit d'un spectre passif (ronds rouge), par la procédure de fit prenant en compte le temps d'intégration présentée dans la section 5.3.3 (courbe noire). On mesure  $\sigma = 3,4 \cdot 10^{-7} N/m$  et  $\kappa = 5,4 \cdot 10^{-20} J$ . Fit d'un spectre actif de la même vésicule (carrés verts) en utilisant la même procédure (courbe bleue). On mesure  $\sigma = 1,2 \cdot 10^{-7} N/m$  et  $\kappa = 1,5 \cdot 10^{-19} J$

Ensuite nous avons utilisé l'expression du spectre passif, utilisée pour fitter les spectres passifs, pour caractériser les courbes actives (équation 5.20 p. 106). Cette expression fitte correctement le comportement aux petits vecteurs d'onde (à partir du mode 5), mais s'écarte de façon nette des points expérimentaux aux grands vecteurs d'onde. Ceci permet cependant de mesurer, sur une même vésicule, une baisse active de la tension membrane, qui passe de  $\simeq 3 \cdot 10^{-7} N/m$  pour les spectres passifs, à des valeurs comprises entre  $7 \cdot 10^{-8}$  et  $1 \cdot 10^{-7} N/m$ . Le module de courbure de son côté augmente d'un facteur 2 dans les cas actifs (Tableau C.7 p. 186). Une telle augmentation est inattendue, mais elle est due à l'inadéquation de la procédure de fit aux grands vecteurs d'onde comme on peut le voir sur la figure 6.11.

Le comportement linéaire des courbes actives et passives en échelle logarithmique suggère de mesurer les exposants de ces lois de puissances apparentes (voir chapitre 5 5.4.2 p. 112). Les résultats de ces fits sont résumés dans le tableau C.8 en annexe p. 187. On remarque une augmentation systématique de cet exposant lors de l'activation des protéines. Ceci traduit une diminution de la valeur du vecteur d'onde de coupure  $q_c = \sqrt{\sigma/\kappa}$ , cohérente avec une baisse active de la tension membranaire.

Cependant, cette comparaison avec l'expression des spectres passifs (tenant compte du temps d'intégration), bien qu'elle nous permette de mettre en évidence une baisse de la tension membranaire, n'est pas satisfaisante et il nous faut maintenant comparer nos spectres actifs avec les modèles théoriques possibles.

**Conclusion : L'activité de pompage de la BR induit une diminution de la tension membranaire.**

### 6.5.3 Modélisations théoriques possibles

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces spectres actifs, il est nécessaire de s'appuyer sur un modèle pour pouvoir en déduire des paramètres physiques caractérisant l'activité protéique. Parmi les modélisations théoriques présentées dans le chapitre 3, deux modèles prévoient une amplification des fluctuations à la limite  $q \rightarrow 0$  et  $\sigma \neq 0$  : le modèle de N. Gov [Gov, 2004], et celui de Lomholt [Lomholt, 2006b].

Dans cette limite le modèle de N. Gov prévoit un terme actif additionnel en  $q^{-3}$  pour le modèle de "force directe". Ce terme est dominé par la contribution de la tension en  $q^{-2}$  à petits vecteurs d'onde. Les lois de puissances apparentes mesurées sur les spectres varient d'une vésicule à l'autre, et ne suggère pas l'apparition d'un comportement actif en  $q^{-3}$  (tableau en annexe C.8 p. 187). Si on prend l'exemple des spectres de figure la 6.9, les spectres passifs (correspondant, on le rappelle, à l'observation d'une coupe de la vésicule) suivent une loi de puissance apparente en  $q^{-2}$ , ce qui correspond à une loi en  $q^{-3}$  pour le spectre de fluctuations de la membrane vue dans son ensemble. Ceci est dû au fait qu'on se trouve dans le crossover entre le régime dominé par la tension, et celui dominé par la rigidité de courbure. Pour les spectres actifs, la loi de puissance apparente est en  $q^{-2,8}$ , ce qui correspond à un comportement en  $q^{-3,8}$  pour le spectre de fluctuations de la membrane vue dans son ensemble. Ce comportement en  $q^{-3,8}$  n'est pas en accord avec l'apparition d'un terme actif en  $q^{-3}$ . De plus les autres vésicules étudiées ont des changements de lois de puissances différents, qui ne s'expliquent pas non plus par les prédictions de ce modèle. Ce modèle ne permet donc pas d'expliquer l'amplification active des fluctuations observées.

Le modèle de Lomholt, quand à lui, prévoit une modification active de la tension qui peut affecter l'amplitude des fluctuations aux faibles vecteurs d'onde de façon importante. Cette approche est cohérente avec les modifications des lois de puissances apparentes dues à l'activité protéique. En effet une diminution de la tension explique à

la fois l'amplification de l'amplitude des fluctuations aux faibles vecteurs d'onde ainsi que l'augmentation (en valeur absolue) de l'exposant des lois de puissances apparentes. Nous avons donc choisi ce modèle pour analyser nos résultats. Mais pour cela, il faut l'adapter pour tenir compte des conditions expérimentales.

**Conclusion : Le modèle de Lomholt est la description théorique, à priori, la plus adaptée à la description de nos résultats expérimentaux.**

#### 6.5.4 Adaptation du modèle de Lomholt

Nous avons présenté dans le chapitre 3 l'expression calculée par Lomholt [Lomholt, 2006a], du spectre de fluctuations d'une vésicule active en harmoniques sphériques. Nous allons utiliser cette expression pour analyser nos résultats expérimentaux.

Nous avons vu précédemment que la BR a un faible couplage à la courbure (estimé à  $\Xi = 2.10^{-29} J.m$ ). Pour simplifier l'expression du spectre on impose donc que  $\Xi = 0$ . Par ailleurs, des simulations faites par Lomholt (figure 3.2 p. 66) montrent que le terme de bruit interne (shot-noise) ne donne de contribution significative que pour les grands modes, et de plus est nettement plus faible que l'effet du terme proportionnel à  $F_{(2)}$  (paramètre proportionnel au dipôle hydrodynamique actif) [Lomholt, 2006a]. Les effets que nous observons expérimentalement sont présents principalement aux petits vecteurs d'onde. De plus, même si on néglige le bruit "shot-noise" ( $\Gamma_a = 0$ ), le terme restant (proportionnel à  $F_{(2)}^2$ ) suffit à la modélisation des effets actifs aux grands vecteurs d'onde. Ceci permet de simplifier l'expression pour avoir le minimum de paramètres de fit pertinents.

Dans ces conditions l'expression du spectre devient :

$$\langle |u_{lm}|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\tilde{E}_l} \left\{ 1 + \frac{F_{(2)}^2}{\chi} \times \frac{(l+2)^2(l-1)^2}{4\tilde{E}_l(1 + \frac{\tau_{\kappa,l}}{\tau_{D,l}})} \right\} \quad (6.6)$$

Avec

$$\tilde{E}_l = [\kappa l(l+1) + \tilde{\sigma} R_0^2](l+2)(l-1) \quad (6.7)$$

$$\tau_{\kappa,l} = \frac{\eta R_0^3(4l^3 + 6l^2 - l)}{\tilde{E}_l l(l+1)} \quad (6.8)$$

$$\tau_{D,l} = \frac{R_0^2}{D_{\Delta\Delta} l(l+1)} \quad (6.9)$$

$$(6.10)$$

Pour comparer les prédictions du modèle de Lomholt à nos mesures expérimentales, il faut d'abord écrire le spectre en termes de vecteur d'onde  $q$ , puis prendre en compte le fait qu'on observe une coupe horizontale de la vésicule.

Pour passer des harmoniques sphériques aux vecteurs d'onde on remplace  $l$  par  $q \times R$  en ne gardant que les termes dominants en  $l$ . [Pécreaux *et al.*, 2004] ont montré que la différence entre le spectre calculé en harmoniques sphériques, et celui calculé en géométrie plane en fonction du vecteur d'onde  $q$ , pour une membrane passive, est négligeable devant l'erreur expérimentale de la mesure à partir du mode numéro 5.

En modifiant l'expression comme décrit ci-dessus, le spectre s'écrit :

$$\langle |u(q_x, q_y)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \tilde{\sigma} q^2} \left\{ 1 + \frac{F_{(2)}^2}{4\chi} \times \frac{q^2}{\kappa q^2 + 4\eta D_{\Delta\Delta} q + \tilde{\sigma}} \right\} \quad (6.11)$$

avec  $D_{\Delta\Delta}$  coefficient de diffusion des protéines qui vaut typiquement  $10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ . L'expérience de détection de contour ne permet de mesurer les fluctuations que sur une coupe de la vésicule. Pour prendre ceci en compte il faut appliquer au spectre une transformée de Fourier inverse selon la composante  $q_y$  du vecteur d'onde, avec  $y = 0$  :

$$\langle |u(q_x, y = 0)|^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle |u(q_x, q_y)|^2 \rangle dq_y \quad (6.12)$$

Pour simplifier l'intégration on néglige le terme  $4\eta D_{\Delta\Delta} q$  dans 6.11 qui est de l'ordre de  $10^{-9} \text{ N/m}$  pour  $q \sim 10^6 \text{ m}^{-1}$ . Il est plus petit que  $\sigma$  qui est au minimum de l'ordre de  $10^{-8} \text{ N/m}$ , et est plutôt de l'ordre de l'erreur faite dans la mesure de la tension.

$$\langle |u(q_x, y = 0)|^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \tilde{\sigma} q^2} + \frac{F_{(2)}^2}{4\chi} \frac{k_B T}{(\kappa q^2 + \tilde{\sigma})^2} \right\} dq_y \quad (6.13)$$

L'intégration donne l'expression suivante :

$$\langle |u(q_x, y = 0)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\tilde{\sigma}} \left[ \frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{q_x^2 + \frac{\tilde{\sigma}}{\kappa}}} \right] + \frac{F_{(2)}^2 n_{0,\Sigma}}{16\kappa^2} \times \frac{1}{(q_x^2 + \frac{\tilde{\sigma}}{\kappa})^{3/2}} \quad (6.14)$$

avec  $\tilde{\sigma} = \sigma_{0,\phi} + \sigma_{0,dip}$  où  $\sigma_{0,\phi}$  est la tension de la membrane passive, et  $\sigma_{0,dip}$  la contribution active à la tension.

Nous allons donc utiliser cette expression pour analyser nos résultats.

### 6.5.5 Analyse des résultats par le modèle de Lomholt

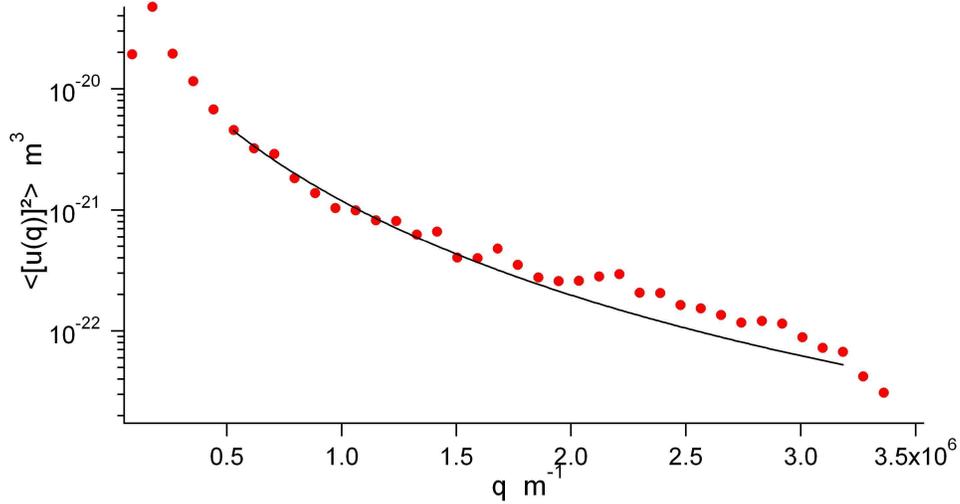
Nous avons vu dans la section 6.5.2 que la procédure de fit prenant en compte le temps d'intégration ne donne pas de résultats concluants. Nous allons commencer l'analyse de nos spectres en les caractérisations par une procédure plus simple. Nous détaillerons ensuite les résultats de l'analyse des spectres actifs par l'expression adaptée de la théorie de Lomholt.

**Caractérisation simple des spectres.**

Dans un premier temps, pour caractériser les spectres de façon simple sur toute la gamme de vecteurs d'onde accessibles, nous avons choisi d'utiliser comme fonction de fit l'équation du spectre passif, sans prise en compte du temps d'intégration :

$$\langle |u(q_x)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\sigma} \left[ \frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right] \quad (6.15)$$

Celle-ci ne dépend que de la tension membranaire et du module de courbure. On peut donc l'utiliser pour mesurer ces deux paramètres. Comme on peut le voir sur la figure 6.12 pour une membrane EPC+BR passive, cette expression fitte correctement les spectres.



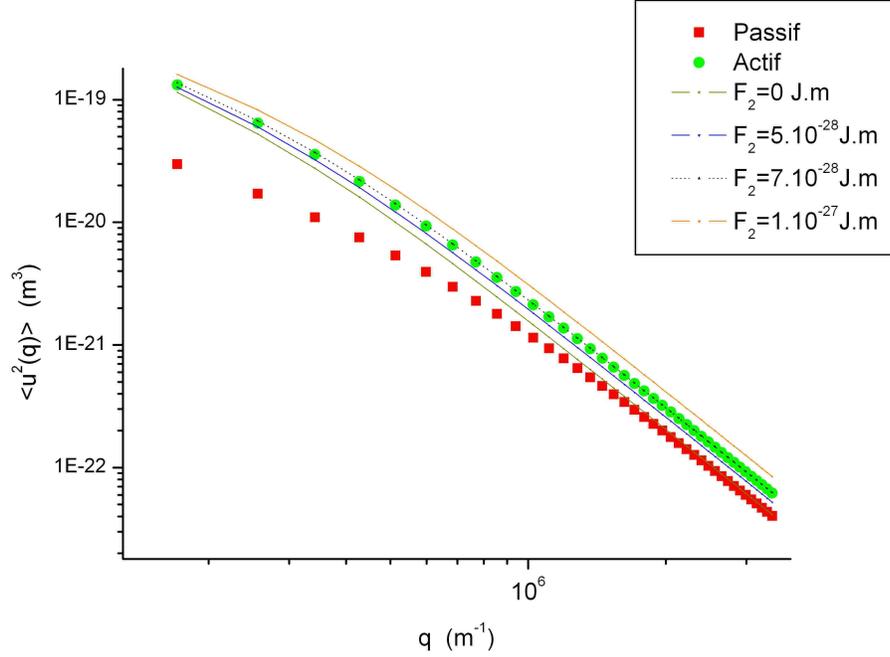
**Fig. 6.12.** Fit d'un spectre de fluctuations passif (ronds rouge), par le spectre passif équation 6.15 (courbe continue). On mesure  $\sigma = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa_{ap} = 5,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ .

L'effet du temps d'intégration de la caméra réduit fortement l'amplitude des fluctuations aux grands vecteurs d'onde (figure 5.6 p. 107). L'expression 6.15 ne prend pas en compte cet effet. Ceci implique que le module de courbure mesuré de cette façon n'est qu'un module de courbure "apparent  $\kappa_{ap}$ " fortement surestimé (un ordre de grandeur), et n'est plus une mesure du module de rigidité de courbure de la membrane. Il peut néanmoins être utile pour une étude comparative. La mesure de la tension membranaire par cette méthode est cependant moins sensible au temps d'intégration et peut donc être considérée comme fiable.

Nous avons utilisé cette procédure de fit sur les spectres de la figure 6.9. Nous avons obtenu, typiquement,  $\sigma \simeq 3 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$  et  $\kappa_{ap} \simeq 6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  pour les spectres passifs, et

$\sigma \simeq 5.10^{-8} N/m$  et  $\kappa_{ap} \simeq 4.10^{-19} J$  pour les spectres actifs. Ceci confirme la nette diminution active de la tension membranaire (résultats complets : tableau C.9 p. 188).

### Simulations



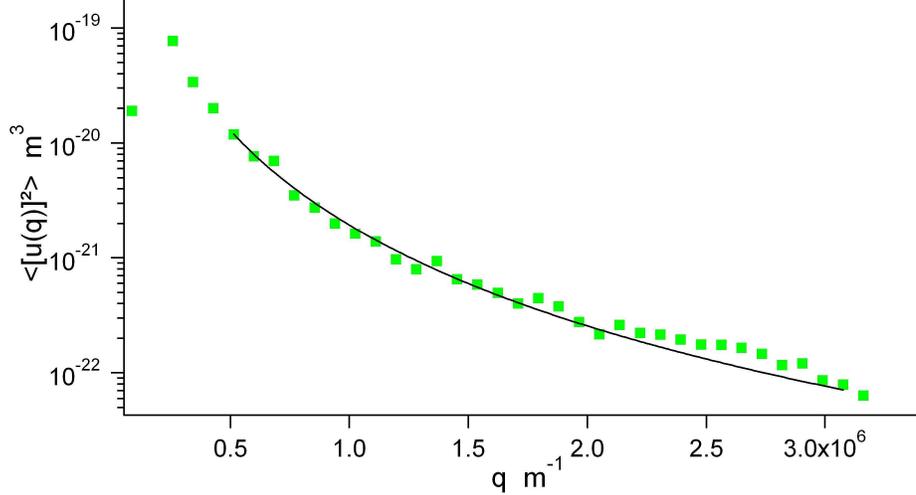
**Fig. 6.13.** Spectre passif (carrés rouges) :  $[\tilde{\sigma} = 3.10^{-7} N/m, \kappa_{ap} = 6.10^{-19} J]$ ; spectre actif (ronds verts) :  $[\sigma = 5.10^{-8} N/m, \kappa_{ap} = 4.10^{-19} J]$ . Calcul de spectres  $\langle |u(q)|^2 \rangle$  issus de la théorie de Lomholt prenant en compte l'effet hors-équilibre (courbes continues) :  $[\tilde{\sigma} = 5.10^{-8} N/m, \kappa_{ap} = 6.10^{-19} J]$ ,  $F_{(2)}$  est varié : 0 J.m (jaune foncé);  $5.10^{-28} J.m$  (bleu);  $7.10^{-28} J.m$  (pointillés noirs);  $10^{-27} J.m$  (orange). Dans toutes ces courbes le rayon est fixé à  $R_0 = 1, 17.10^{-5} m$ .

Pour confronter nos résultats expérimentaux au modèle de Lomholt, on peut tracer des spectres en utilisant les valeurs de tension et de module de courbure apparent mesurées, sur les spectres de la figure 6.9, par la procédure de fit simple exposée p. 152 et qui donne  $[\sigma \simeq 3.10^{-7} N/m, \kappa_{ap} \simeq 6.10^{-19} J]$  pour les spectres passifs (courbe en carrés rouges de la figure 6.13), et  $[\sigma \simeq 5.10^{-8} N/m, \kappa_{ap} \simeq 4.10^{-19} J]$  pour les spectres actifs (courbe en ronds verts de la figure 6.13). La réduction de tension peut être interprétée par une valeur négative de  $\sigma_{0,dip} = -2, 5.10^{-7} N/m$  dans le cadre de la théorie de Lomholt. La réduction du module de courbure apparent peut s'interpréter dans le modèle de Lomholt par le terme proportionnel à  $F_{(2)}$  qui peut être responsable

d'un effet aux grands vecteurs d'onde. Pour la simulation, nous avons donc choisi de garder la même valeur de  $\kappa_{ap}$  pour les spectres actifs et passifs, et d'introduire un terme actif proportionnel à  $F_{(2)}^2$  (expression 6.14 p. 150).

Pour évaluer l'effet du terme en  $F_{(2)}$  sur les courbes actives, et estimer sa valeur de  $F_{(2)}$  pour le spectre actif, nous avons simulé les spectres prédits par la théorie de Lomholt avec différentes valeurs de  $F_{(2)}$  ( $0$ ;  $5 \cdot 10^{-28}$ ;  $7 \cdot 10^{-28}$ ;  $10^{-27} J.m$ ) (figure 6.13). On remarque que plus on augmente la valeur de  $F_{(2)}$ , plus l'amplitude des fluctuations augmente aux grands vecteurs d'onde, sans affecter significativement le comportement aux petits vecteurs d'onde (dominé par la tension). Avec une valeur de  $F_{(2)} = 7 \cdot 10^{-28} J.m$  (courbe en pointillés noirs), le spectre issu de la théorie de Lomholt fitte correctement la courbe active. De plus, la valeur trouvée est du même ordre de grandeur que les estimations [Manneville *et al.*, 2001] :  $F_{(2)} = 2w\mathcal{P}_a$  avec  $\mathcal{P}_a \sim 10 k_B T$ , donc  $F_{(2)} \sim 4 \cdot 10^{-28} J.m$ . Nous avons essayé de suivre la même procédure avec une fonction de fit prenant en compte le temps d'intégration de la caméra. Cependant, la différence de forme entre les spectres mesurés et la fonction de fit rend cette méthode impraticable.

### Fit avec la théorie de Lomholt



**Fig. 6.14.** Fit d'un spectre de fluctuations actif (carrés verts) par l'expression issue de la théorie de Lomholt 6.14 en fixant  $\kappa_{ap} = 5,6 \cdot 10^{-19} J$  (mesuré par le fit figure 6.12). On mesure grâce à cette procédure  $\tilde{\sigma} = 5,3 \cdot 10^{-8} N/m$  et  $F_{(2)} = 4,0 \cdot 10^{-28} J.m$

Nous avons poursuivi notre analyse en fittant directement les données expérimentales avec l'expression du spectre issu de la théorie de Lomholt (équation 6.14), en faisant toujours abstraction du temps d'intégration de la caméra. Le fit des spectres

actifs par cette expression avec 3 paramètres ( $\tilde{\sigma}$ ,  $\kappa_{ap}$ , et  $F_{(2)}$ ) n'a pas donné des résultats probants, probablement à cause d'un manque de sensibilité aux grands vecteurs d'onde. Nous avons donc utilisé, d'abord, l'expression passive ( $F_{(2)} = 0$ ) pour mesurer  $\kappa_{ap}$  à partir des spectres passifs d'une vésicule. Ensuite, nous avons fixé la valeur de  $\kappa_{ap}$  obtenue, et fitté les spectres actifs de cette même vésicule par l'expression 6.14 en ayant seulement deux paramètres de fit ( $\tilde{\sigma}$ , et  $F_{(2)}$ ). Dans certains cas, les valeurs mesurées pour  $F_{(2)}$  sont entachées d'une trop grande erreur ( $F_{(2)} = 10^{-29} \pm 10^{-27} J.m$ ) à cause du bruit expérimental affectant les mesures aux grands vecteurs d'onde. Nous avons reporté dans le tableau 6.2 p. 154 les résultats des fits qui donnent des résultats avec des marges d'erreurs raisonnables. On obtient des valeurs de  $F_{(2)}$  du même ordre de grandeur que l'estimation par la simulation (figure 6.13)

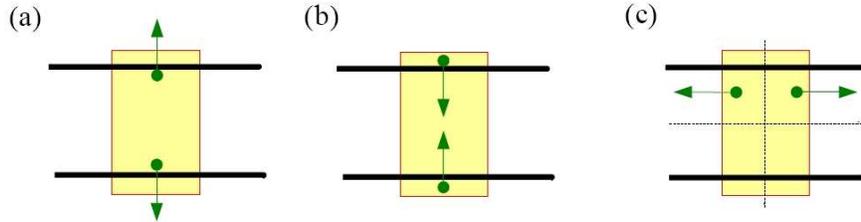
Spectre	tension (N/m)	Module de courbure $\kappa_{ap}$ (J)	$F_{(2)}$ (J.m)
BRJB36-R01	$3, 9.10^{-7} \pm 3.10^{-8}$	$5, 6.10^{-19} \pm 4, 4.10^{-20}$	fixé à 0
BRJB36-J01	$5, 3.10^{-8} \pm 2.10^{-8}$	fixé	$3, 9.10^{-28} \pm 1.10^{-28}$
BRJB36-J02	$7, 9.10^{-8} \pm 6.10^{-9}$	fixé	$9, 6.10^{-28} \pm 1.10^{-28}$
BRJB36-J03	$3, 5.10^{-8} \pm 1.10^{-8}$	fixé	$7, 2.10^{-28} \pm 6.10^{-29}$
BRJB36-R02	$2, 4.10^{-7} \pm 3.10^{-8}$	$6, 0.10^{-19} \pm 5.10^{-20}$	fixé à 0
BRJB36-J01	$5, 4.10^{-8} \pm 2.10^{-8}$	fixé	$4, 9.10^{-28} \pm 9.10^{-29}$
BRJB36-J02	$8, 3.10^{-8} \pm 7.10^{-9}$	fixé	$1, 1.10^{-27} \pm 3.10^{-29}$
BRJB36-J03	$3, 6.10^{-8} \pm 1.10^{-8}$	fixé	$8, 0.10^{-28} \pm 6.10^{-29}$
BRJB38-R02	$9, 4.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$4, 8.10^{-20} \pm 9, 02.10^{-21}$	fixé à 0
BRJB38-J03	$4, 9.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	fixé	$4, 4.10^{-28} \pm 3, 36.10^{-29}$
BRJB33-R01	$3, 2.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$5, 1.10^{-19} \pm 2.10^{-20}$	fixé à 0
BRJB33-J03	$1, 1.10^{-7} \pm 3.10^{-9}$	fixé	$4, 1.10^{-28} \pm 3.10^{-29}$
BRJB40-R03	$5, 8.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$3, 6.10^{-19} \pm 2.10^{-20}$	fixé à 0
BRJB40-J01	$3, 7.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	fixé	$2, 7.10^{-28} \pm 5.10^{-29}$

**Tab. 6.2.** *Résultats fit avec le spectre 6.14 : D'abord fit spectre passif en fixant  $F_{(2)} = 0$ . On fit, ensuite les spectres actifs de la même vésicule en fixant la valeur de  $\kappa_{ap}$  à celle mesurée par le fit passif. On mesure ainsi la tension  $\sigma$  et le coefficient  $F_{(2)}$ .*

Ces mesures confirment la baisse systématique et importante de la tension due à l'activité protéique. On ne peut cependant pas tirer de conclusion sur le rapport  $\frac{\sigma_{actif}}{\sigma_{passif}}$ . Mais la variation active de la tension  $|\sigma_{0,dip}|$  est de l'ordre de  $10^{-7} N/m$ . Elle est directement reliée, dans le modèle de Lomholt, au premier moment de la distribution de forces actives, qui est inconnue. Les expressions, simples, utilisées dans les modèles précédents [Manneville *et al.*, 2001, Sankararaman *et al.*, 2002] pour modéliser ces forces actives donnent une variation active de tension de l'ordre  $|\sigma_{0,dip}| \sim 10^{-3} N/m$  [Lomholt, 2006b], trop élevée comparée à nos mesures. Ceci indique que ces expressions simples ne sont

pas adaptées à la description des forces actives dans notre système expérimental.

### Interprétation des résultats



**Fig. 6.15.** Schémas représentant différents types de dipôles actifs : (a) Dipôle normal avec force active  $F_a$  positive, induisant une augmentation active de la tension selon le modèle de Lomholt. (b) Dipôle normal avec force active  $F_a$  négative, induisant une diminution active de la tension selon le modèle de Lomholt. (c) Dipôle latéral dont l'influence n'a pas encore été étudiée théoriquement. (voir section 3.3.4 p. 63 pour la définition de  $F_a$ )

Une des informations importantes que nous avons obtenue de cette étude est le signe de la contribution active à la tension. En effet, dans la majorité des schémas explicatifs, les dipôles hydrodynamiques actifs sont représentés avec des forces orientées vers l'extérieur de la membrane (figure 6.15 (a)), mais la distribution de force étant inconnue rien ne privilégie ce sens. Cette orientation correspond, dans le modèle de Lomholt, à une force active  $F_a$  positive (voir section 3.3.4). Des dipôles de cette forme induirait selon Lomholt une augmentation de la tension due à l'activité [Lomholt, 2006b]. Or les expériences montrent une diminution active de la tension et donc, selon le même modèle, une force  $F_a$  négative. Ceci correspondrait à des dipôles actifs avec des forces orientées vers la membrane (figure 6.15 (b)).

Il est aussi possible de considérer la présence de dipôles actifs dans le plan de la membrane (figure 6.15 (c)). Toutes les théories n'ont considéré, jusqu'à présent, que des dipôles le long de la normale à la membrane (ou selon  $\mathbf{z}$  comme on l'explique dans la section 3.3.4). Cependant, les changements conformationnels d'une pompe par exemple peuvent exercer des forces actives dans le plan de la membrane. Ce genre de force n'est pris en compte dans aucun modèle théorique. De plus selon sa position par rapport au plan médian de la membrane, un dipôle latéral peut induire des effets de courbure active qui peuvent aussi modifier les spectres des fluctuations. Seule une étude détaillée de l'effet de tels dipôles permettrait de conclure sur l'influence qu'ils peuvent avoir sur les fluctuations membranaires, mais il est raisonnable de penser qu'ils peuvent modifier la tension membranaire.

Par ailleurs, on peut comparer les résultats de l'analyse de ces spectres actifs à ceux obtenus par les expériences de micropipettes. Lomholt donne une expression pour la température effective qui, une fois simplifiée compte tenu des hypothèses effectuées (en particulier  $\Gamma_a = 0$ ), devient :

$$\frac{T^{eff}}{T} = 1 + \frac{F_{(2)}^2}{4\chi\kappa} \quad \text{avec} \quad \chi = \frac{k_B T}{n_{0,\Sigma}} \quad (6.16)$$

Les expériences de micropipettes ont montré que  $T^{eff} = 2 \times T$ , ce qui implique que  $F_{(2)} = \sqrt{4\chi\kappa}$  [Manneville *et al.*, 2001]. Si on remplace les grandeurs par leurs valeurs (notamment  $\kappa_{ap} \sim 5.10^{-19} J$ , donné par la procédure de fit sans prendre en compte le temps d'intégration) on trouve  $F_{(2)} \sim 9.10^{-28} J.m$ , ce qui correspond aux résultats du fit. Cependant, on sait que les membranes utilisées ont un module de courbure de l'ordre de  $\kappa = 4.10^{-20} J$  [Manneville *et al.*, 2001], et que la mesure par détection de contours sans correction de l'effet du temps d'intégration surestime la valeur de  $\kappa$  (on ne mesure que  $\kappa_{ap}$ ). Néanmoins, même en prenant la valeur réaliste de  $\kappa$ , la valeur de  $F_{(2)}$  reste du même ordre de grandeur ( $2, 5.10^{-28} J.m$ , bien que plus faible).

Les changements conformationnels ne sont pas la seule origine possible pour les forces actives. Des études récentes [Lacoste *et al.*, 2007, Ambjornsson *et al.*, 2007] montrent que la présence d'un potentiel transmembranaire, maintenu par l'activité protéique, peut aussi être à l'origine de contraintes dipolaires. Cette approche pourrait expliquer la diminution active de la tension. Cependant, une description électrostatique prévoit une augmentation active de la rigidité de courbure, ce qui est en contradiction avec les résultats des expériences de micropipettes [Ambjornsson *et al.*, 2007]. Des approches électrohydrodynamiques pourraient permettre de décrire correctement le comportement dans toutes les gammes de vecteurs d'onde [Lacoste *et al.*, 2007]. Enfin, une étude expérimentale détaillée de l'effet du potentiel membranaire, que l'on mesurerait directement avec une électrode ou indirectement par fluorescence par exemple, sur les fluctuations permettrait de déterminer l'importance relative des effets des changements conformationnels et ceux des potentiels transmembranaires.

Revenons maintenant aux spectres mesurés sur des vésicules EPC-BR en absence d'azide de sodium. Nous avons reporté dans le tableau C.5 p. 185 les exposants  $\nu$  des lois de puissances apparentes de ces spectres (avec illumination non-actinique puis actinique). On remarque une légère augmentation, en valeur absolue (de l'ordre de 0,1), de l'exposant  $\nu$  pour les spectres actifs (notés J#) comparé à sa valeur pour les spectres passifs (notés R#). C'est le cas pour les vésicules BR12 et BR24. Ces constatations suggèrent une légère diminution de la tension due à l'activité protéique, et sont donc en accord avec les effets observés en présence d'azide de sodium. Cependant cette augmentation de  $\nu$  est absente dans les spectres de la vésicule BR25.

Nous concluons de cette confrontation à la théorie que le modèle de Lomholt décrit correctement nos résultats expérimentaux, notamment l'amplification des fluctuations à

petits vecteurs d'onde. Cet effet n'est pas mesurable par l'expérience de micropipettes, car la tension est fixée par l'aspiration. L'amplification mesurée par les expériences de micropipettes est, en fait, reliée au terme proportionnel à  $F_{(2)}^2$  dans la théorie de Lomholt. La mesure de ce paramètre à partir des spectres de fluctuations donne des valeurs du même ordre de grandeur que celle estimée par les expériences de micropipettes. Ceci confirme donc la cohérence des résultats obtenus par les deux techniques.

**Conclusion :** La théorie de Lomholt décrit correctement les résultats de nos expériences avec une diminution active de la tension de l'ordre de  $|\sigma_{0,dip}| \sim 10^{-7} N/m$ , et un terme quadripolaire de l'ordre  $F_{(2)} \sim 10^{-28} J.m$ .



---

## Conclusion :

---

Les membranes cellulaires interviennent directement dans différents processus biologiques importants ; une modélisation satisfaisante des membranes biologiques est donc nécessaire pour comprendre ces mécanismes cellulaires. Cependant, la complexité de ces membranes est telle qu'il est nécessaire de se limiter, dans un premier temps, à des modélisations simplifiées. Des paramètres mésoscopiques issus de ces modélisations, comme le module de courbure et la tension membranaire, sont actuellement largement utilisés pour décrire le comportement des membranes. La physique des membranes de composition simple (un composant) et à l'équilibre est bien comprise maintenant. Une grande partie de l'effort de recherche sur les systèmes membranaires est consacrée dorénavant à l'étude de systèmes plus complexes, comme la membranes à plusieurs composants, l'étude des interactions protéines-membranes ou cytosquelette-membrane, ou encore l'introduction d'effets hors-équilibre. Le travail de thèse que nous avons présenté s'inscrit dans cette dernière direction.

Les membranes cellulaires contiennent un grand nombre de protéines qui, pour accomplir leurs rôles, consomment de l'énergie (sous forme d'hydrolyse de l'ATP ou absorption d'énergie lumineuse) comme les pompes ioniques par exemple. L'activité de ces inclusions fait que la membrane est loin de l'équilibre thermodynamique. Plusieurs modèles, que nous avons décrits dans le chapitre 3, ont été développés pour décrire les propriétés de ce genre de système en prenant en compte différents types de forces actives et de couplages entre les protéines et les membranes. Ces modèles s'intéressent en particulier à l'effet de l'activité des inclusions sur les fluctuations membranaires dont ils prédisent le spectre pour chaque modélisation. Toutes ces approches théoriques s'accordent sur l'émergence d'une amplification active des fluctuations membranaires, mais prévoient dans le détail différents spectres actifs. L'amplification active de l'amplitude des fluctuations avait été déjà vérifiée expérimentalement, sur des systèmes modèles, par des expériences de micropipettes décrites dans le chapitre 4. Cependant, pour tran-

cher entre les prédictions des différentes modélisations théoriques, il est nécessaire de mesurer le spectre de fluctuations de membranes actives, ce que nous avons fait dans notre travail de thèse.

Nous avons utilisé un montage de mesure de spectre de fluctuations par analyse de contours construit dans le laboratoire par Jacques Pécréaux . Nous avons d'abord mesuré des spectres de fluctuations de vésicules purement lipidiques (SOPC et EPC). Nous avons montré dans le chapitre 5, qu'en analysant ces spectres, on peut raisonnablement mesurer la tension des membranes. Cependant, à cause des effets dus à la gravité, la mesure du module de courbure est surestimé pour les vésicules d'un rayon de l'ordre de 30  $\mu m$  et au-delà. On ne dispose pas, à l'heure actuelle d'expression de fit prenant en compte ces effets, ce qui nous oblige à utiliser des vésicules de petite taille.

Nous avons effectué des expériences comparatives, entre membranes actives et passives, contenant la bactériorhodopsine. Nous avons montré que la présence d'azide de sodium est nécessaire pour l'apparition d'effets actifs mesurables par les techniques de micropipettes et d'analyse de contours. En présence de 1 mM d'azide de sodium, l'activité protéique induit une amplification de l'amplitude des modes de fluctuations particulièrement forte aux petits vecteurs d'onde. Ce résultat constitue la première mesure d'effets actifs à cette échelle de longueur. Ils permettent aussi de trancher en faveur du modèle théorique développé par M. Lomholt, qui permet d'interpréter nos résultats. Une description complète prenant ces effets en compte serait nécessaire pour utiliser la technique de spectroscopie de fluctuations de manière plus générale.

Cette confrontation avec la théorie permet d'interpréter l'amplification des fluctuations aux petits vecteurs d'onde comme une baisse active de la tension membranaire. Cette baisse est due à une contribution négative des effets de l'activité à la tension  $\sigma_{0,dip} \sim -10^{-7} N/m$ . Ce terme additionnel est le premier moment des forces actives, et son signe nous renseigne donc sur la nature de la distribution de ces forces. Nous avons aussi réussi à mesurer l'ordre de grandeur du terme quadripolaire  $F_{(2)} \sim 10^{-28} J.m$ , responsable des effets actifs aux grands vecteurs d'onde. Cette valeur est cohérente avec les résultats des expériences de micropipettes réalisées par J.B. Manneville sur ce système.

Nous avons aussi entrepris d'étudier les effets actifs sur les membranes contenant l'ATPase- $Ca^{2+}$  pour également mesurer les spectres de fluctuations avec une autre protéine active. Par ailleurs, la difficulté d'obtenir des vésicules adaptées à la détection de contours (qui est difficile à mettre en œuvre) nous a empêchés de continuer ces expériences. La technique de mesure de spectres de fluctuations utilisée par [Popescu *et al.*, 2006] a l'avantage de permettre de comparer directement des spectres issus de vésicules de tailles différentes, et pourrait être une technique alternative à la détection de contours pour effectuer ce type de mesures.

L'étude des membranes actives aux très petites échelles pourrait donner des informations complémentaires aux techniques optiques. Nous avons réalisé des mesures de réflectivité de rayons X sur des structures lipidiques multilamellaires contenant la BR

(présentées en annexe D p. 189). Nous n'avons pas pu détecter d'effet de l'activité sur la périodicité du multilamellaire. Malheureusement, à cette période, nous n'avons pas encore réalisé l'importance de la présence de l'azide de sodium, que nous n'avons pas utilisé pour ces expériences. Il serait intéressant de refaire ce type de mesures sur le système en présence d'azide de sodium et de vérifier si nous observons un changement dans la périodicité lié à l'activité de la BR.

La mesure du spectre de fluctuations n'est pas la seule approche possible pour caractériser les membranes hors-équilibre. La mesure de la force nécessaire à l'extraction d'un tube pourrait être un bon moyen de mesurer les propriétés des membranes actives. En effet cette force, à l'équilibre, dépend de la tension et du module de courbure, et pourrait donc être modifiée par l'activité protéique. De plus, sa mesure par une pince optique est très sensible. Ce type d'approche n'a pas été considéré jusqu'à présent, ni d'un point de vu théorique, ni expérimentalement.

Par ailleurs, la théorie de Lomholt explique la baisse de la tension membranaire comme un résultat de l'application, par les inclusions actives, de dipôles de forces normaux et compressifs à la membrane. Dans tous les modèles développés jusqu'à présent ces forces dipolaires ont toujours été prises normales à la membrane. La présence d'effets majeurs sur la tension suggère d'étudier le cas de dipôles de forces appliqués dans le plan de la membrane. Une telle approche permettrait de prendre en compte les forces actives de façon plus générale, car a priori ces forces actives ne sont pas nécessairement selon la normale à la membrane. L'étude de l'effet de dipôles actifs latéraux sur l'expression du spectre de fluctuations serait donc une direction intéressante à explorer d'un point de vu théorique.

L'origine exacte des forces actives est aussi une question digne d'intérêt. En effet, elles peuvent résulter des changements conformationnels des protéines qui agissent directement ou indirectement (par couplage hydrodynamique) sur la membrane. Mais ces forces peuvent avoir aussi une origine électrostatique (ou électrohydrodynamique) du fait des potentiels transmembranaires qu'induit l'activité de pompage des protéines. Pour faire la part des effets qui sont dus aux changements de conformations et ceux qui proviennent des effets des potentiels transmembranaires, il est nécessaire de mesurer, à la fois, les spectres de fluctuations et l'évolution du potentiel transmembranaire. Une autre possibilité serait d'étudier des protéines qui ont des caractéristiques très différentes :

- La F1/F0 ATP-synthase qui est à la fois une pompe ionique et un puissant moteur rotatif (donc avec forte interaction hydrodynamique).
- Les ABC-transporteurs qui ont des changements de conformations d'une très grande amplitude (donc forte interactions directes avec la membrane).
- Les canaux ioniques qui sont caractérisés par des forces de perméation actives et de forts changements du potentiel transmembranaire.

La comparaison des effets actifs pour ces différents types de centres actifs permettrait

d'isoler la contribution de chaque type de couplage, et ainsi, à long terme, de développer des modélisations réalistes des membranes cellulaires.

## A.1 Protocole d'électroformation.

La technique d'électroformation est une méthode qui permet de fabriquer des vésicules unilamellaires géantes (GUVs). Elle a été développée par [Angelova *et al.*, 1992], puis améliorée par [Mathivet *et al.*, 1996]. Elle consiste à appliquer un champ électrique alternatif à un film de lipides déposé sur une surface conductrice (ITO par exemple). Ce film est hydraté (on a formation de structures multilamellaires) avant l'application de ce champ qui décolle les bicouches lipidiques et permet ainsi la formation de vésicules géantes unilamellaires (5-150  $\mu m$ ). Une interprétation théorique de ce mécanisme a été proposée par [Sens et Isambert, 2002], sans pour autant donner une explication complète de ce qui se passe au cours de ce processus de formation.

Nous allons détailler, dans la suite, la préparation des dépôts, leur hydratation, pour finir par la description de l'électroformation proprement dite.

### A.1.1 Préparation des lames conductrice.

Pour former une chambre d'électroformation nous avons besoin de deux lames de verre, chacune recouverte sur une face d'une couche d'Indium Tin Oxyde (ITO) qui assure la conductivité. On a collé sur un bord de cette face un espaceur en Teflon, qui permet d'avoir un écartement entre les deux faces conductrices de 1 mm, quand on joint les deux lames ITO ensemble.

Ces lames sont nettoyées :

- à l'eau MQ pour enlever les impuretés solubles dans l'eau.
- à l'éthanol pour enlever les traces de marqueur.

- puis essuyées 3 fois avec du papier optique imbibé de chloroforme.

On s'arrête à ce stade pour les dépôts de lipides solubilisés dans un solvant organique. Pour les suspensions de lipides dans une solution aqueuse, on continue le nettoyage :

- rinçage à l'éthanol, puis à l'eau MQ.
- séchage à l'azote.

### A.1.2 Dépôt lipidique.

La méthode de dépôt dépend de la solution utilisée pour solubiliser les lipides. Pour préparer des vésicules ne contenant que des lipides, on solubilise ces derniers dans un solvant organique, le plus souvent du chloroforme. Pour déposer un film de lipide sur une lame ITO à partir d'une solution de lipides solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 1 mM, il suffit d'en déposer un petit volume (10 à 20  $\mu\text{l}$ ) et de l'étaler sur la surface. Le chloroforme s'évapore, en quelques secondes, laissant un dépôt de lipides sur la lame, qu'on stocke sous vide pour au moins 2 heures.

Dans certains cas il est impossible d'utiliser des solvants organiques. C'est le cas pour la fabrication de vésicules géantes contenant des protéines par exemple. Dans ces conditions, il est possible de former un dépôt à partir d'une solution aqueuse contenant des SUVs ou des LUVs de la composition souhaitée (ou éventuellement un mélange de liposomes de différentes compositions). On dépose sur la surface ITO des gouttes de 2  $\mu\text{l}$  typiquement à 0,8 mg/ml en lipides, qu'on peut sécher de différentes manières. Pour préserver l'activité des protéines, nous avons séché ces gouttes dans une atmosphère de vapeur saturante en équilibre avec une solution saturée en NaCl. Cette méthode permet un séchage partiel qui préserve donc l'activité protéique. Il est possible de sécher ces gouttes dans une enceinte à vide. L'activité des protéines est préservée en ajoutant du sucrose à la solution aqueuse de dépôt (de 20 à 100 mg de sucrose par gramme de lipides et protéines) [Doeven *et al.*, 2005]. Pour optimiser le rendement de la pousse pour chaque composition, il est important d'essayer différentes concentrations et volumes des gouttes déposées.

Quelle que soit la méthode, on se retrouve à la fin avec un dépôt qui est le point de départ de l'électroformation.

### A.1.3 Hydratation et électroformation.

La chambre d'électroformation est formée à l'aide d'une pâte à sceller (Vitrex) qui permet de définir un compartiment étanche entre les deux lames ITO. On place aussi une électrode autocollante en cuivre sur chaque espaceur en Teflon. En mettant les deux lames ITO l'une contre l'autre chaque électrode est en contact avec une des surface conductrice.

On remplit la chambre ainsi formée avec la solution destinée à constituer la solution intérieure des vésicules (généralement une solution de sucrose). On ferme ensuite la

chambre avec la pâte à sceller en évitant de former des bulles à l'intérieur de la chambre.

On relie, à l'aide des électrodes en cuivre, la chambre de pousse à un GBF à travers une rampe qui permet d'augmenter la tension par paliers d'une durée de 5 minutes, en commençant de 20 mV (60mV, 200mV, 500mV, 800mV). La tension se stabilise ensuite à 1,1 V pour une durée allant de 2 à 5 heures. On obtient des vésicules géantes à la fin de ce processus.

## A.2 Protocole de reconstitution de la BR par détergent.

Nous allons détailler dans cette section le protocole de reconstitution de la BR dans en petits liposomes à l'aide du détergent Triton X. Ce protocole se fait en deux étapes :

1. Solubilisation des lipides et des protéines dans le détergent.
2. Retrait du détergent à l'aide de biobeads, et formation spontanée de protéoliposomes.

### A.2.1 Solubilisation de la BR.

La BR que nous avons utilisée provient du laboratoire d'Oesterhelt en Allemagne. Elle se présente sous la forme de fragments de membrane pourpre (membrane native avec un rapport lipides/BR de 10, donc très riche en protéines sous forme cristalline) suspendus dans de l'eau à une concentration de 6,4 mg/ml. On utilise le Triton X 100 pour solubiliser ces fragments de membrane pourpre :

- On prend 50  $\mu\text{g}$  de BR, ce qui correspond à 7,8  $\mu\text{l}$  à une concentration de 6,4 mg/ml.
- On ajoute 2,5  $\mu\text{l}$  de Triton X 100 à 10% (10% correspond à 100 mg/ml). On a donc un rapport massique **détergent/protéine = 5**.
- On amène la concentration de BR à 1 mg/ml en ajoutant 40  $\mu\text{l}$  d'eau.
- On laisse le mélange sous agitation magnétique douce à 4°C durant une nuit.

### A.2.2 Solubilisation des lipides.

Nous avons utilisé dans nos expériences le mélange EPC. Ces lipides sont solubilisés dans du chloroforme. Il est donc nécessaire de passer par une étape d'évaporation, et de ressuspendre les lipides dans une solution aqueuse pour ensuite les solubiliser avec du Triton X 100.

**Evaporation et suspension dans l'eau.**

- On met une solution chloroforme de lipides à une concentration allant de 0,5 à 1 mg/ml. La quantité de lipides totale correspond à 2 mg.
- On évapore le chloroforme avec un évaporateur rotatif. Le ballon est plongé dans un bain à 37 °C.
- Le ballon est stocké dans une enceinte à vide pendant 2 heures.
- On ajoute 1 ml d'eau pour avoir une suspension de lipides à 2 mg/ml.
- On agite avec un vortex pour détacher le dépôt lipidique de la surface.
- On sonique avec un sonicateur à pointe pendant 2 minutes pour homogénéiser la solution. Le ballon est maintenu dans un bain eau + glace pour éviter la dégradation thermique des lipides.
- La solution est ensuite stockée à -20 °C jusqu'à son utilisation

**Solubilisation.**

La suspension aqueuse de lipides est solubilisé avec du Triton X 100 avec un rapport **détergent/lipides de 1,3** en poids. D'autre part le rapport lipides/protéines doit être de l'ordre de 7. Pour 50  $\mu$ g de protéines il faut 350  $\mu$ g de lipides :

- On prend 175  $\mu$ l de solution aqueuse d'EPC à 2 mg/ml.
- On ajoute 4,5  $\mu$ l de Triton X 100 à 10% (100 mg/ml).
- On met le mélange sous agitation magnétique douce à température ambiante pendant une demi-heure.

**A.2.3 Retrait du détergent.**

On commence par mélanger les lipides et les protéines solubilisés pendant 1 heure sous agitation magnétique douce à température ambiante à un rapport massique **lipides/protéines de 7**. Le retrait du détergent se fait à l'aide de biobeads (SM2 Bio-Beads 25-50 mesh Bio-Rad, Hercules, CA) qui sont de petites billes en polystyrène de quelques millimètres de diamètre. Nous allons présenter le protocole de nettoyage des biobeads, puis celui de leur utilisation.

**Nettoyage des biobeads.**

- Mettre une spatule de biobeads dans un becher.
- Ajouter de l'éthanol ou du méthanol. Volume correspondant à 3-4 fois le volume de biobeads.
- Laisser sous agitation magnétique douce pendant une demi-heure.
- Retirer l'éthanol ou le méthanol.
- Rincer 3 fois à l'eau MQ en laissant, à chaque fois sous agitation magnétique pendant 10 minutes.

- retirer les biobeads qui flottent à la surface (Billes abimées). Garder celles qui sédimentent
- conserver les biobeads à 4 °C pour un mois maximum. Passé ce délai, il faut les nettoyer suivant la procédure que nous venons de décrire.

### **Utilisation des biobeads.**

Pour la reconstitution de la BR, il faut retirer le détergent de façon plus douce que pour d'autres protéines (Serca1a ou Intégrine). Les biobeads sont ajoutée en trois fois à un rapport massique **biobeads/détergent allant de 10 à 15** à chaque fois. Après chaque addition, on laisse le mélange sous agitation magnétique douce à température ambiante pendant 1 heure.

Pour les quantités utilisées dans ce protocole cela fait 7 à 10,5 mg de biobeads à ajouter à chaque fois.

A la fin de cette étape de retrait de détergent, on pipette la solution de protéoliposomes (qui se sont formés spontanément au cours de la déplétion du détergent), et on la stocke à -20 °C.

## **A.3 Protocole de reconstitution de la BR par l'éther.**

Nous allons présenter dans cette section le protocole de reconstitution de la BR par solubilisation dans l'éther. Les étapes de ce protocole sont :

1. Solubilisation des lipides dans l'éther.
2. Lyophilisation de la BR
3. Mélange lipides-BR.
4. Dépôt sur lames ITO.

### **A.3.1 Solubilisation des lipides.**

- On met 1 ml d'une solution chloroforme de lipides (EPC) à une concentration de 0,5 mg/ml dans un ballon.
- On évapore le chloroforme avec un évaporateur rotatif. Le ballon est plongé dans un bain à 37 °C.
- Le ballon est stocké dans une enceinte à vide pendant 2 heures.
- On ajoute 1 ml d'éther dans le ballon, qu'on vortex. Cette étape est à faire juste avant l'étape de mélange lipides BR. Il faut garder le ballon sur de la glace pour limiter l'évaporation.

### A.3.2 Lyophilisation de la BR.

- On utilise un aliquot de 80  $\mu\text{l}$  d'une suspension aqueuse de membranes pourpres (membrane native de la BR) à 0,275 mg/ml. La BR est généralement stockée à -20 °C.
- On décongèle un aliquot de 80  $\mu\text{l}$  à 0,275 mg/ml et on le vortex.
- On le plonge dans de l'azote liquide.
- Puis on le place rapidement dans la pompe à palette (chez D. Levy) pour sublimer l'eau (1 à 2 heures). La pompe est reliée à un piège à vapeur d'eau.
- On obtient une poudre de membrane pourpre.
- Sortir la BR du vide juste avant l'étape de mélange lipides-BR.

### A.3.3 Mélange lipides-BR.

- La BR lyophilisée et le ballon contenant la solution de lipides dans l'éther sont gardés sur de la glace. L'éther étant très volatile, il faut effectuer le maximum d'étapes à basse température pour limiter l'évaporation.
- On ajoute 100  $\mu\text{l}$  de la solution de lipides (dissout dans l'éther) à la BR lyophilisée.
- On sonique le mélange à l'aide d'un sonicateur à pointe, en utilisant la plus basse puissance. On garde l'échantillon en contact avec un mélange eau-glace.
- On remet l'échantillon sur la glace, le temps de le transporter pour faire le dépôt tout de suite après.

### A.3.4 Dépôt sur les lames ITO.

#### Nettoyage.

Ces lames sont nettoyées :

- à l'eau MQ pour enlever les impuretés solubles dans l'eau.
- à l'éthanol pour enlever les traces de marqueur.
- puis essuyées 3 fois avec du papier optique imbibé de chloroforme.

#### Dépôt.

- Le dépôt se fait dans une chambre froide à 4 °C pour limiter l'évaporation de l'éther.
- On dépose sur chaque lame ITO 7 à 10  $\mu\text{l}$  du mélange lipides-BR à l'aide d'une pipette. On étale le dépôt sur une région prédéfinie jusqu'à l'évaporation de la majorité de l'éther.
- L'échantillon du mélange lipides-BR doit être gardé sur de la glace.
- Les lames ITO avec le dépôt sont stockées dans une enceinte à vide pendant au moins 3 heures.

Pour obtenir des vésicules géantes contenant de la BR, on utilise la méthode d'électroformation (présentée dans la section A.1) à partir de ces dépôts.

## **A.4 Protocole de marquage de la BR avec Alexa 488.**

Pour marquer la BR avec une molécule fluorescente, nous avons d'abord utilisé le protocole de marquage avec la FITC présenté dans [Manneville, 1999] (adapté de [Heberle et Dencher, 1992]). Cependant, la FITC pose des problèmes de photoblanchiment en imagerie par fluorescence. Nous avons donc choisit de marquer la BR avec une molécule Alexa 488, plus stable et brillante. Nous allons présenter dans la suite le protocole de marquage utilisé.

### **A.4.1 Réaction de marquage**

Nous avons utilisé un Kit de marquage Molecular Probes (A-10235) :

- On prépare une solution de 1 ml de bicarbonate de sodium à 1 M. (pH 8,3) (inclus dans le kit)
- On prépare une solution de BR à 2 mg/ml.
- On ajoute 50  $\mu$ l de la solution de bicarbonate de sodium à 1 M, à 0,5 ml de solution de BR à 2 mg/ml. Ce qui correspond à 1 mg de protéines à marquer.
- Transférer la solution de protéine ainsi préparée dans la fiole contenant la molécule fluorescente pour effectuer la réaction de liaison entre l'Alexa et la protéine.
- On laisse sous agitation magnétique pendant 1 heure à température ambiante.

### **A.4.2 rinçage de la protéine.**

Comme la protéine est sous forme de fragments de membrane pourpre, on peut utiliser des étapes de rinçage par centrifugation (même procédure similaire à celle du protocole pour FITC [Manneville, 1999]). Chaque centrifugation se fait à 4 °C, dure 10 à 15 minutes, à 40 000 trs/min (rotor TLA 100.4).

- On centrifuge 2 fois, en resuspendant, à la même concentration, les membranes pourpres dans une solution de bicarbonate de sodium à 1M.
- On laisse la solution sous agitation à 4 °C toute une nuit.
- On lave 3 fois par centrifugation avec une solution de KCl à 200 mM.
- On lave au moins 3 fois par centrifugation à l'eau MQ.
- La protéine marquée est ensuite stockée à -20 °C

## A.5 Protocole de greffage de molécule PEG sur les surfaces de verre.

Nous allons présenter dans cette section le protocole de greffage de molécules PEG sur la surface de lamelles en verre.

### A.5.1 activation de la surface.

On active la surface en utilisant le mélange "piranha"

- On fixe les lamelles de verre sur un support en Teflon.
- on prépare un mélange "piranha" : 30% eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) + 70% acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) dans cet ordre. Cette manipulation est dangereuse, se renseigner sur les mesures de sécurité.
- Plonger le support avec les lamelles dans le mélange piranha. Laisser réagir pendant une demi-heure.
- Mettre le support dans un bécher avec de l'eau MiliQ.
- Rincer 3 fois à l'eau MiliQ.

### A.5.2 Silanisation.

La réaction de silanisation se fait dans du Méthanol :

- Rincer les lamelles 2 fois au Méthanol.
- Préparer le mélange suivant (120 ml), en ajoutant les composants dans cet ordre :
  1. 110 ml de Méthanol.
  2. 4,6 ml de  $H_2O$ .
  3. 946  $\mu l$  d'acide acétique.
  4. 2,34 ml de Mercaptopropyltriméthoxysilane (silane  $C_6H_6O_3SSi$ ). Le silane se conserve sous argon.
- On plonge les lamelles dans ce mélange, et on les laisse à température ambiante pendant 2 heures. Le bécher est fermé avec du parafilm.

### A.5.3 Greffage du PEG.

- Rincer les lamelles au moins 2 fois au Méthanol.
- Les sécher à l'azote.
- Les mettre au four à 120 °C pendant 5 minutes.
- Préparer une solution de PEG : 7,5 à 10 mg de Malaémide-PEG-5000 dans 1 ml de PBS.
- Disposer les lamelles dans des boîtes de Petri (directement ou sur du Kimewipes).

## A.5. Protocole de greffage de molécule PEG sur les surfaces de verre.

171

---

- Déposer sur chaque lamelle 100  $\mu\text{l}$  de solution PEG. On la recouvre ensuite avec un morceau de parafilm.
- Laisser à température ambiante pendant 1 heure puis à 4 °C une nuit (ou seulement 2 heures à température ambiante).
- Rincer chaque lamelle à l'eau MilliQ.
- Sécher les lamelles à l'azote.
- Stocker dans une enceinte à vide.



## ANNEXE B

---

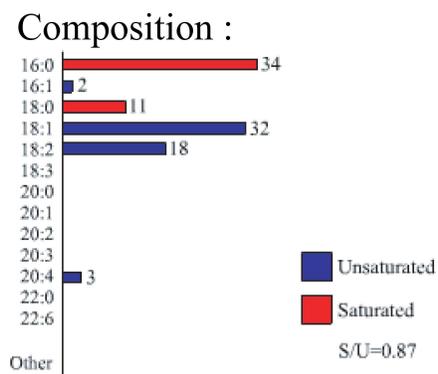
Molécules.

---

### B.1 Lipides.

EPC :

Egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (MW = 760,09 g/mol en moyenne)

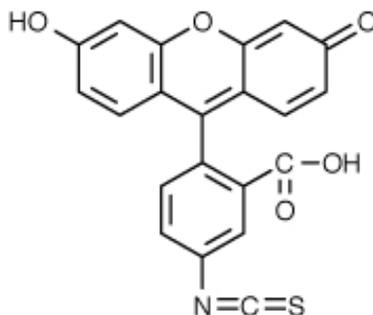




## B.3 Molécules fluorescentes.

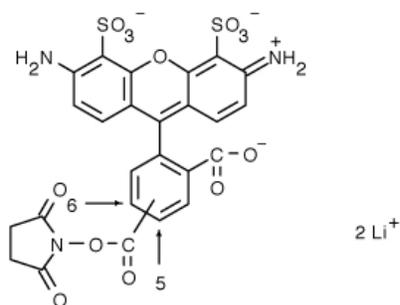
### FITC :

Fluorescein isothiocyanate (MW = 389.38 g/mol). Maximum d'absorption pour 495 nm et maximum d'émission pour 525 nm.



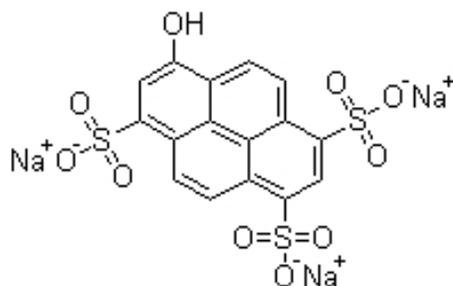
### Alexa 488 :

Marqueur Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (MW = 643 g/mol). Maximum d'absorption pour 494 nm et maximum d'émission pour 519 nm.



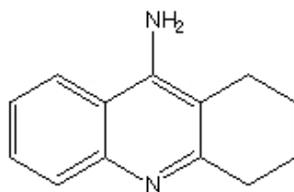
**Pyranine :**

Trisodium 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulphonate (MW = 524.38 g/mol).



**9-Aminoacridine :**

(MW = 194.238 g/mol)



## ANNEXE C

---

Données additionnelles.

---

## C.1 Analyse de spectres passifs SOPC, EPC et EPC-BR.

Vésicule	module de courbure ( $10^{-19} J$ )	Rayon de la vésicule ( $\mu m$ )
EPC01	$2,6 \pm 0,2$	33
EPC03	$1,4 \pm 0,1$	12
EPC04	$0,7 \pm 0,1$	13
EPC05	$1,0 \pm 0,1$	13
EPC10	$0,7 \pm 0,1$	15
EPC13-1	$0,8 \pm 0,2$	13
EPC13-2	$1,5 \pm 0,2$	-
EPC13-3	$0,7 \pm 0,2$	-
EPC14-1	$1,1 \pm 0,3$	15
EPC14-1	$0,9 \pm 0,2$	-
EPC14-1	$0,4 \pm 0,2$	-

**Tab. C.1.** *Mesure du module de courbure par procédure de fit avec temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106), pour des vésicules EPC.*

Vésicule	Tension ( $10^{-7} N/m$ )	Moyenne par vésicule ( $10^{-7} N/m$ )
SOPC1-1	$2,3 \pm 0,08$	2,3
SOPC1-2	$2,2 \pm 0,08$	-
SOPC1-3	$2,1 \pm 0,04$	-
SOPC1-4	$2,5 \pm 0,03$	-
SOPC1-5	$2,4 \pm 0,05$	-
SOPC3-1	$3,2 \pm 0,08$	3,3
SOPC3-2	$3,5 \pm 0,01$	-
SOPC3-3	$3,2 \pm 0,06$	-
SOPC4-1	$4,0 \pm 0,08$	4,0
SOPC4-2	$4,2 \pm 0,06$	-
SOPC4-3	$3,8 \pm 0,10$	-
SOPC5-1	$2,6 \pm 0,06$	2,6
SOPC5-2	$2,6 \pm 0,05$	-
SOPC5-3	$3,0 \pm 0,03$	-
SOPC5-4	$2,4 \pm 0,03$	-
SOPC6-1	$2,4 \pm 0,07$	2,4
SOPC6-2	$2,4 \pm 0,04$	-
SOPC6-3	$2,4 \pm 0,05$	-
SOPC6-4	$2,3 \pm 0,05$	-
SOPC6-5	$2,6 \pm 0,03$	-
SOPC7-1	$2,9 \pm 0,06$	2,9
SOPC7-2	$2,6 \pm 0,01$	-
SOPC7-3	$3,1 \pm 0,04$	-
SOPC7-4	$3,1 \pm 0,07$	-

**Tab. C.2.** *Mesure de la tension par procédure de fit avec temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106), pour des vésicules SOPC.*

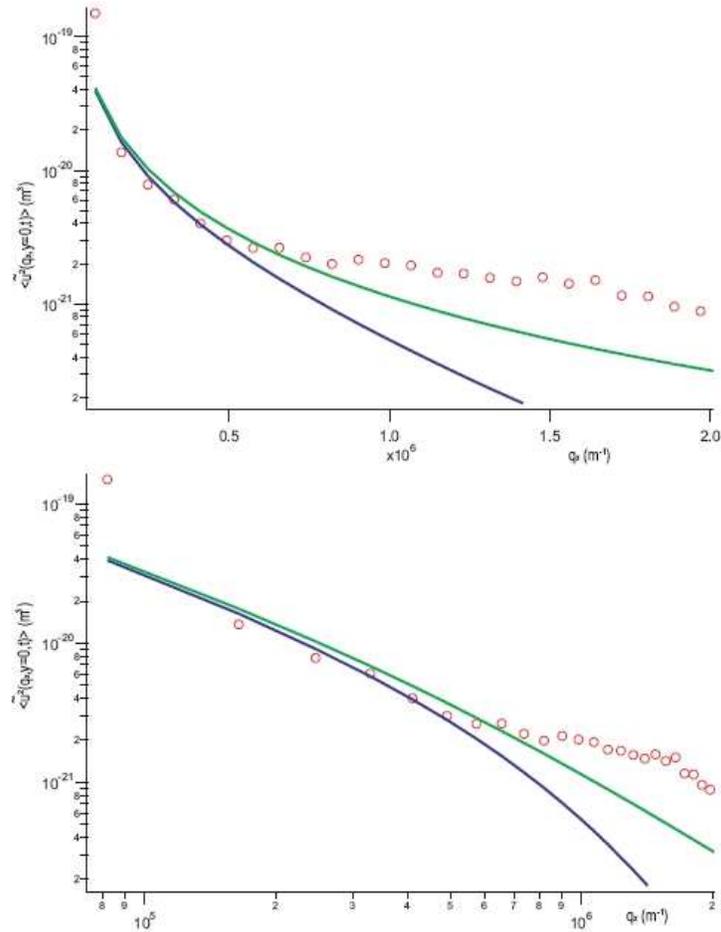
Vésicule	module de courbure ( $10^{-19} J$ )	Moyenne pondérée ( $10^{-19} J$ )	Rayon de la vésicule ( $\mu m$ )
SOPC1-1	$4,4 \pm 0,4$	2,9	25
SOPC1-2	$4,4 \pm 0,4$	-	-
SOPC1-3	$4,1 \pm 0,4$	-	-
SOPC1-4	$2,3 \pm 0,2$	-	-
SOPC1-5	$3,3 \pm 0,3$	-	-
SOPC3-1	$5,2 \pm 0,5$	3,7	30
SOPC3-2	$4,0 \pm 0,4$	-	-
SOPC3-3	$3,2 \pm 0,3$	-	-
SOPC4-1	$4,4 \pm 0,4$	3,1	28
SOPC4-2	$3,1 \pm 0,3$	-	-
SOPC4-3	$2,1 \pm 0,2$	-	-
SOPC5-1	$4,3 \pm 0,4$	3,0	25
SOPC5-2	$3,7 \pm 0,4$	-	-
SOPC5-3	$2,6 \pm 0,3$	-	-
SOPC5-4	$4,3 \pm 0,4$	-	-
SOPC6-1	$4,7 \pm 0,5$	3,8	32
SOPC6-2	$5,3 \pm 0,5$	-	-
SOPC6-3	$5,2 \pm 0,5$	-	-
SOPC6-4	$5,2 \pm 0,5$	-	-
SOPC6-5	$2,8 \pm 0,3$	-	-
SOPC7-1	$4,5 \pm 0,4$	3,9	31
SOPC7-2	$5,6 \pm 0,6$	-	-
SOPC7-3	$4,0 \pm 0,4$	-	-
SOPC7-4	$2,8 \pm 0,3$	-	-

**Tab. C.3.** *Mesure du module de courbure par procédure de fit avec temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106), pour des vésicules SOPC.*

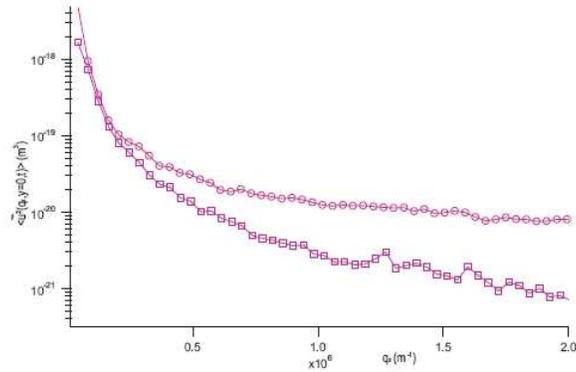
Vésicule	module de courbure ( $10^{-20} J$ )	Rayon de la vésicule ( $\mu m$ )
EPC-BR11-1	$7,7 \pm 0,8$	11
EPC-BR11-2	$3,8 \pm 0,7$	-
EPC-BR12-1	$2,4 \pm 0,8$	14
EPC-BR12-2	$6,4 \pm 1,2$	-
EPC-BR12-3	$7,6 \pm 0,9$	-
EPC-BR14-1	$1,2 \pm 0,9$	14
EPC-BR14-2	$1,5 \pm 1,3$	-
EPC-BR15	$2,0 \pm 0,5$	12
EPC-BR18-1	$16 \pm 1,4$	27
EPC-BR18-2	$19 \pm 4,9$	-
EPC-BR18-3	$13 \pm 1,3$	-
EPC-BR19-1	$10 \pm 2,1$	31
EPC-BR19-2	$13 \pm 3,5$	-
EPC-BR20-1	$18 \pm 1,0$	24
EPC-BR20-2	$19 \pm 1,4$	-
EPC-BR20-3	$16 \pm 0,8$	-
EPC-BR33-1	$7,6 \pm 1,0$	22
EPC-BR33-2	$1,9 \pm 0,5$	-
EPC-BR33-3	$4,4 \pm 0,5$	-
EPC-BR36-1	$4,5 \pm 1,0$	11
EPC-BR36-2	$6,2 \pm 1,6$	-
EPC-BR36-3	$4,7 \pm 0,8$	-

**Tab. C.4.** *Mesure du module de courbure par procédure de fit avec temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106), pour des vésicules EPC-BR (reconstitution par l'éther).*

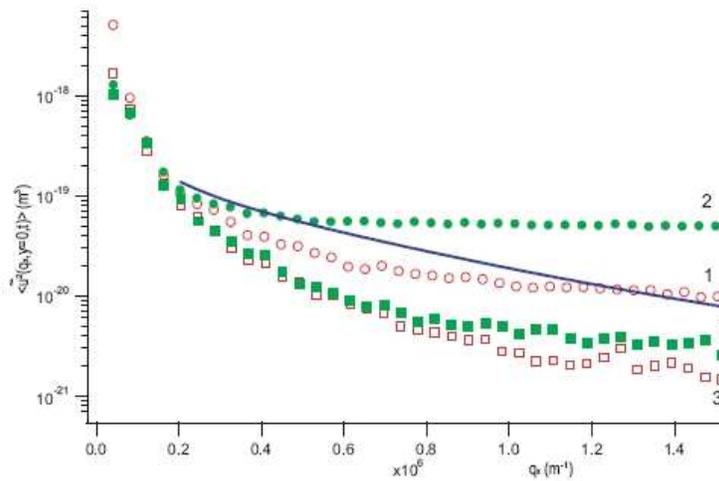
## C.2 Résultats Jacques Pécréaux .



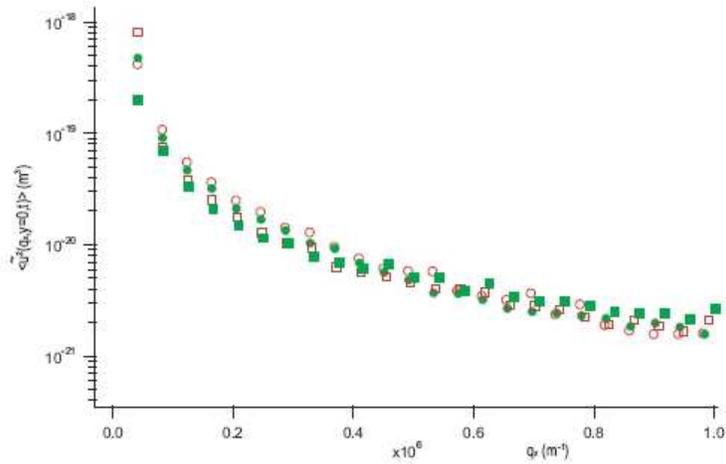
**Fig. C.1.** Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine, éclairée en rouge et ayant complètement relaxé le gradient de protons. Les points violets représente la mesure expérimentale, tandis que la ligne bleue représente le spectre attendu pour une vésicule de même tension ( $\sigma = 3.1 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ ) et de module de rigidité de courbure  $\kappa = 11 \times 10^{-20} \text{ J}$ , valeur classique pour SOPC. On note que la courbe expérimentale s'écarte notablement de la courbe pour une simple vésicule passive. Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours. [Pécréaux, 2004]



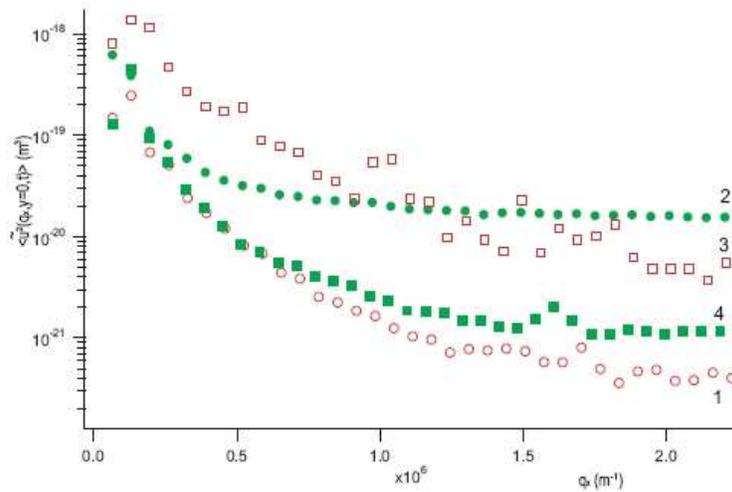
**Fig. C.2.** Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la bactériorhodopsine éclairée en rouge et ayant relaxé le gradient de protons, et ensuite juste après un éclairage de 4 minutes en jaune (carrés violets). Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours. [Pécéréaux, 2004]



**Fig. C.3.** Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). La ligne bleu représente le spectre attendu avec les paramètres déduits des expériences de micropipettes (notamment  $\mathcal{P}_a = 4 \times 10^{-20} \text{ J.m}$ , une tension ajustée pour «fitter» au mieux la courbe  $\sigma = 8.9 \times 10^{-8} \text{ N/m}$ , et la densité de protéines  $\rho = 1.5 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$ ) sans la prise en compte de l'intégration en temps. Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours à chaque fois. [Pécéréaux, 2004]



**Fig. C.4.** Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours à chaque fois. [Pécreaux, 2004]



**Fig. C.5.** Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). [Pécreaux, 2004]

### C.3 Analyse de spectres EPC-BR actifs sans azide de sodium.

Spectres	Loi de puissance $\nu$		
BR12		BR25	
R1	$-1,72 \pm 0,03$	R1	$-2,03 \pm 0,02$
R2	$-1,73 \pm 0,03$	R2	$-1,91 \pm 0,02$
J6	$-1,85 \pm 0,03$	R3	$-2,13 \pm 0,02$
J9	$-1,85 \pm 0,03$	J1	$-2,34 \pm 0,06$
BR24		J2	$-2,12 \pm 0,05$
R1	$-1,60 \pm 0,04$	R4	$-2,10 \pm 0,03$
R2	$-1,64 \pm 0,04$	R5	$-2,08 \pm 0,03$
R3	$-1,60 \pm 0,03$	R6	$-2,05 \pm 0,02$
J1	$-1,73 \pm 0,03$	J4	$-2,09 \pm 0,01$
J2	$-1,71 \pm 0,04$	J5	$-2,07 \pm 0,02$
R4	$-1,47 \pm 0,04$	J6	$-2,06 \pm 0,02$
R5	$-1,46 \pm 0,04$	R7	$-2,01 \pm 0,02$
R6	$-1,57 \pm 0,04$	R8	$-2,04 \pm 0,02$
J4	$-1,72 \pm 0,03$	R9	$-2,01 \pm 0,03$
J5	$-1,78 \pm 0,03$	J7	$-2,05 \pm 0,03$
J6	$-1,73 \pm 0,03$	J8	$-1,90 \pm 0,02$

**Tab. C.5.** Exposant de la loi de puissance des spectres de fluctuation pour trois vésicules EPC-BR en absence d'azide de sodium (reconstitution par détergent). Les spectres passifs sont notés R# et les spectres actifs J#.

Spectres	tension $\sigma$ (N/m)	M. courbure $\kappa$ (j)
BR12		
R1	$3,3 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-9}$	$4,0 \cdot 10^{-20} \pm 2 \cdot 10^{-21}$
R2	$2,9 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-9}$	$9,8 \cdot 10^{-20} \pm 2 \cdot 10^{-21}$
J6	$2,9 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-19} \pm 2 \cdot 10^{-21}$
J9	$3,0 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-9}$	$9,0 \cdot 10^{-20} \pm 2 \cdot 10^{-21}$

**Tab. C.6.** Mesure de la tension et du module de courbure par procédure de fit avec temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106), pour des vésicules EPC-BR en absence d'azide de sodium (reconstitution par détergent). Les spectres passifs sont notés R# et les spectres actifs J#.

## C.4 Analyse spectres EPC-BR actifs avec azide de sodium.

Spectre	Tension $\sigma$ (N/m)	$\kappa(J)$
BRJB36		
R1	$3, 4.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$5, 4.10^{-20} \pm 1, 4.10^{-20}$
R2	$2, 8.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$7, 1.10^{-20} \pm 2, 0.10^{-20}$
R3	$3, 3.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$5, 3.10^{-20} \pm 1, 0.10^{-20}$
J1	$1, 2.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$1, 5.10^{-19} \pm 2, 1.10^{-20}$
J2	$9, 8.10^{-8} \pm 6.10^{-9}$	$9, 2.10^{-20} \pm 1, 0.10^{-20}$
J3	$7, 3.10^{-8} \pm 8.10^{-9}$	$1, 4.10^{-19} \pm 1, 7.10^{-20}$

**Tab. C.7.** *Mesure de la tension et du module de courbure par fit de spectres de fluctuation par l'expression théorique du spectre passif tenant compte du temps d'intégration (section 5.3.3 p. 106) pour une vésicule EPC-BR en présence d'azide de sodium (reconstitution par l'éther). Les spectres passifs sont notés R# et les spectres actifs J#.*

Spectres	Loi de puissance $\nu$		
<hr/>		<hr/>	
BRJB36		BRJB40	
R1	$-2,15 \pm 0,04$	R1	$-1,18 \pm 0,03$
R2	$-2,14 \pm 0,04$	R2	$-1,59 \pm 0,03$
R3	$-2,17 \pm 0,05$	J1	$-1,65 \pm 0,02$
J1	$-2,70 \pm 0,04$	J2	$-1,73 \pm 0,03$
J2	$-2,78 \pm 0,06$	<hr/>	
J3	$-2,87 \pm 0,07$	BRJB38	
<hr/>		R1	$-1,53 \pm 0,08$
BRJB33		R2	$-1,33 \pm 0,04$
R1	$-1,86 \pm 0,02$	J1	$-1,72 \pm 0,07$
R2	$-1,50 \pm 0,03$	J2	$-1,75 \pm 0,03$
R3	$-1,67 \pm 0,03$	R3	$-1,48 \pm 0,03$
J3	$-2,08 \pm 0,03$	J3	$-1,65 \pm 0,09$
<hr/>		J4	$-1,88 \pm 0,02$
BRJB31			
R2	$-1,52 \pm 0,03$		
J1	$-1,69 \pm 0,03$		
J2	$-1,83 \pm 0,03$		

**Tab. C.8.** *Exposant de la loi de puissance apparente des spectres de fluctuations de vésicules EPC-BR en présence d'azide de sodium (reconstitution par l'éther). Les spectres passifs sont notés R# et les spectres actifs J#.*

Spectre	Tension $\sigma$ (N/m)	$q_c^2$ ( $m^{-2}$ )	$\kappa$
<b>BRJB36</b>			
R1	$3, 9.10^{-7} \pm 3.10^{-8}$	$6, 8.10^{11} \pm 1, 1.10^{11}$	$5, 6^{-19} \pm 1, 4^{-19}$
R2	$2, 4.10^{-7} \pm 3.10^{-8}$	$4, 0.10^{11} \pm 8.10^{10}$	$6, 0^{-19} \pm 2, 1^{-19}$
R3	$3, 7.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$6, 8.10^{11} \pm 8.10^{10}$	$5, 5^{-19} \pm 1, 0^{-19}$
J1	$5, 3.10^{-8} \pm 2.10^{-8}$	$1, 1.10^{11} \pm 4.10^{10}$	$4, 8^{-19} \pm 3, 8^{-19}$
J2	$6, 4.10^{-8} \pm 4.10^{-9}$	$2, 4.10^{11} \pm 2.10^{10}$	$2, 7^{-19} \pm 5^{-20}$
J3	$3, 0.10^{-8} \pm 9.10^{-9}$	$8, 2.10^{10} \pm 3.10^{10}$	$3, 6^{-19} \pm 2, 8^{-19}$
<b>BRJB33</b>			
R2	$5, 8.10^{-7} \pm 9.10^{-9}$	$2, 4.10^{12} \pm 2.10^{11}$	$2, 4^{-19} \pm 2^{-20}$
J1	$3, 5.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$1, 4.10^{12} \pm 1.10^{11}$	$2, 5^{-19} \pm 2^{-20}$
J2	$3, 6.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$9, 9.10^{11} \pm 10.10^{10}$	$3, 7^{-19} \pm 5^{-20}$
<b>BRJB33</b>			
R1	$3, 2.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$6, 2.10^{11} \pm 4.10^{10}$	$5, 1^{-19} \pm 5^{-20}$
R2	$2, 5.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$1, 3.10^{12} \pm 1.10^{11}$	$1, 9^{-19} \pm 3^{-20}$
R3	$2, 7.10^{-7} \pm 4.10^{-9}$	$9, 1.10^{11} \pm 5.10^{10}$	$2, 9^{-19} \pm 20^{-20}$
J3	$1, 1.10^{-7} \pm 2.10^{-9}$	$2, 7.10^{11} \pm 1.10^{10}$	$4, 2^{-19} \pm 3^{-20}$
<b>BRJB38</b>			
R1	$7, 6.10^{-7} \pm 3.10^{-8}$	$5, 2.10^{13} \pm 2.10^{13}$	$1, 4^{-20} \pm 8^{-21}$
R2	$9, 4.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$2, 0.10^{13} \pm 4.10^{12}$	$4, 8^{-20} \pm 1^{-20}$
J1	$6, 6.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$1, 9.10^{13} \pm 6.10^{12}$	$3, 5^{-20} \pm 1^{-20}$
J2	$2, 7.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$1, 2.10^{12} \pm 2.10^{11}$	$2, 3^{-19} \pm 5^{-20}$
R3	$4, 7.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$5, 8.10^{12} \pm 9.10^{11}$	$8, 2^{-20} \pm 2^{-20}$
J3	$4, 4.10^{-7} \pm 2.10^{-8}$	$9, 8.10^{14} \pm 2.10^{15}$	$4, 5^{-22} \pm 8^{-22}$
J4	$2, 6.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$8, 9.10^{11} \pm 9.10^{10}$	$3, 0^{-19} \pm 4^{-20}$
<b>BRJB40</b>			
R1	$3, 9.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$1, 9.10^{12} \pm 2.10^{11}$	$2, 1^{-19} \pm 4^{-20}$
R3	$5, 8.10^{-7} \pm 1.10^{-8}$	$1, 6.10^{12} \pm 1.10^{11}$	$3, 6^{-19} \pm 3^{-20}$
J1	$3, 7.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$1, 2.10^{12} \pm 7.10^{10}$	$3, 2^{-19} \pm 8^{-20}$
J2	$3, 4.10^{-7} \pm 7.10^{-9}$	$9, 4.10^{11} \pm 6.10^{10}$	$3, 6^{-19} \pm 10^{-20}$

**Tab. C.9.** *Mesure du vecteur de crossover, de la tension et du module de courbure en fittant par l'expression du spectre passif simple (équation 6.15 p. 151) pour des vésicules EPC-BR en présence d'azide de sodium (reconstitution par l'éther). Les spectres passifs sont notés R# et les spectres actifs J#.*

---

## Expérience de reflectivité de rayons X.

---

Dans le cadre du réseau européen SoftComp, nous avons collaboré avec l'équipe de Tim Salditt, pour effectuer des mesures de réflectivité de rayon X sur des structures multilamellaires constituées de membranes "active" contenant la BR [Giahi *et al.*, 2007]. Nous présenterons dans cette section, les prédictions de différents modèles théoriques, sur l'effet de l'activité protéique sur des membranes confinées, ainsi que le montage expérimentale utilisé, pour finir par exposer les résultats de ces expériences.

### D.1 Principe de l'expérience.

Dans une structure multilamellaire, chaque membrane est confinée par ses voisines. Nous avons vu dans le chapitre 3 qu'on peut modéliser le comportement des membranes dans un tel système en étudiant le cas plus simple d'une membrane fluctuant à une distance  $d$  d'une paroi. La présence de cette paroi confine la membrane et empêche le développement de fluctuations d'une amplitude supérieure à la distance les séparant. On a donc une réduction du nombre de conformations possibles, donc une diminution de l'entropie du système. Ceci donne naissance à une pression entropique répulsive entre la membrane et la paroi. Helfrich a dérivé l'expression de cette pression répulsive (que l'on appelle par conséquent pression de Helfrich [Helfrich, 1973b]) :

$$P(d) \propto \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^3} \tag{D.1}$$

Si on revient au système multilamellaire, l'espacement entre les membranes est le résultat de l'équilibre entre les différents types d'interaction (Van der Waals, électrostatiques,

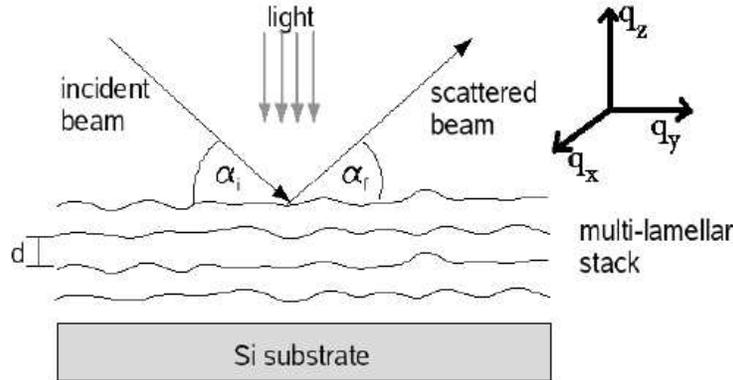
hydratation, ...etc). La pression répulsive de Helfrich, de portée supérieure aux forces de Van der Waals, participe de façon significative à l'établissement de cette distance d'équilibre.

Dans un système multilamellaire actif, les fluctuations sont amplifiées par l'activité des protéines. La pression de répulsion de Helfrich étant d'origine entropique, l'amplification des fluctuations devrait augmenter la pression répulsive. On s'attend, intuitivement, à une augmentation de l'espacement entre membrane dans la structure multilamellaire.

Une analyse en loi d'échelle faite par [Prost *et al.*, 1998], en se basant sur le modèle de canaux ioniques, montre que le confinement augmente l'amplification des fluctuations. Ils en déduisent que l'activité protéique induit une pression répulsive additionnelle qui s'écrit :

$$P_a(d) \propto \frac{\lambda_p F_a^2 \rho}{D \kappa d} \quad (\text{D.2})$$

Cependant, le modèle de canaux ionique ne prend pas en compte le couplage à la courbure, et qui suppose l'existence d'une force nette liée à la perméation à travers les canaux (section 3.2.1 p. 54). [Sankararaman *et al.*, 2002] ont utilisé le formalisme du modèle RTP, qui est plus adapté au cas des pompes. Ils trouvent que l'activité dans un milieu confiné induit une augmentation de la tension, donc une diminution des fluctuations, et de la pression répulsive. D'après ce modèle, l'espacement serait réduit par l'activation des protéines.



**Fig. D.1.** Schéma de la mesure de réflexion des rayons X sur une structure multilamellaire de période  $d$ . [Giahi *et al.*, 2007]

La mesure de la réflectivité des rayons X est adaptée pour vérifier ces prédictions, car elle permet de mesurer l'espacement entre membranes  $d$  dans une structure lamellaire, sur une très grande gamme de longueurs (allant de 0,5 à 100 nm). En changeant

l'angle d'incidence  $\theta$  du faisceau, l'intensité réfléchi présente des pics pour certaines inclinaisons, pour lesquelles les réflexions sur les différentes membranes sont cohérentes. Ces angles d'incidences particuliers sont donnés par la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = k\lambda \quad (\text{D.3})$$

Si on défini  $q_z = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$  comme la différence entre le vecteur d'onde de réflexion, et celui d'incidence, la loi de Bragg devient  $q_z = n \frac{2\pi}{d}$ . En mesurant les valeurs de  $q_z$  correspondantes au pics de Bragg, on a directement accès à la période du multilamellaire  $d$ .

## D.2 Protocoles.

La structure multilamellaire est formé par le séchage d'une solution aqueuse, contenant des SUVs, sur un wafer de silicium de taille  $10 \times 15 \text{ mm}^2$  ou  $15 \times 25 \text{ mm}^2$ . Le wafer est nettoyé par sonication dans un bain de méthanol, puis dans l'eau MQ. Ensuite il est traité avec une solution aqueuse de KOH pour le rendre hydrophile. Il est disposé sur un support parfaitement horizontal, et on dépose dessus  $200 \mu\text{l}$  de solution de SUVs de la composition souhaitée, qu'on laisse sécher une nuit. Cette procédure permet d'avoir une structure multilamellaire bien alignée. Les SUVs utilisées pour préparer les multilamellaires actifs ont été faites selon le même protocole de reconstitution que celui utilisé pour la pousse de GUVs (protocole A.2 p. 165).

Deux types de mesures de réflectivité ont été conduites sur les structure multilamellaires :

- Des mesures dans une chambre contenant un bain d'eau saturé en sel qui fixe l'humidité. L'échantillon est hydraté par l'humidité de l'atmosphère de la chambre dont la température est contrôlée ( $40 - 42^\circ\text{C}$ ). La source de rayons X correspond à la raie Cu  $K_\alpha$  ( $E = 8,048 \text{ keV}$ ). Le signal réfléchi a été mesuré par un détecteur "fast scintillation counter" (Cyberstar, Oxford-Danfysik), avec un système d'atténuation automatisé.
- Des mesures sur des échantillons immergés dans une solution aqueuse. Dans ce cas, le faisceau de rayons X devant traverser 10 mm d'eau, il est nécessaire d'utiliser une source de photons plus énergétiques (Mo  $K_\alpha$ ,  $E = 17,48 \text{ keV}$ ). Pour en assurer la stabilité dans un milieu aqueux, il est nécessaire d'appliquer une pression osmotique sur le multilamellaire. Ceci est fait en solubilisant des polymères PEG de masse molaire 20000 g/mol. Une solution concentrée à 3,6 % en masse impose une pression osmotique de l'ordre de  $10^4 \text{ Pa}$  [Mennicke *et al.*, 2006].

L'échantillon était activé par une source lumineuse halogène froide (KL1500, Schott), équipé de différents filtres passe-bas (en fréquence) avec des longueurs d'onde de coupure de 600 nm pour la lumière rouge, et 500 nm pour la lumière jaune. Elle est positionnée à une distance de 20 cm de l'échantillon.

### D.3 Résultats.

Dans le cadre du programme de mobilité de SoftComp, nous avons réalisé une première série de mesures, en collaboration avec Aram Giahi à l'université de Göttingen dans les laboratoires de l'équipe dirigée par Tim Salditt. Nous avons effectué des mesures de réflectivité en chambre humide, sur des structures lamellaires EPC contenant la BR. L'espacement des membranes sans illumination (dans le noir) était  $d = 51,6 \text{ \AA}$ , mais lorsqu'on illuminait l'échantillon avec de la lumière jaune (actinique), l'espacement diminuait à  $d = 48,5 \text{ \AA}$ . Pour étudier la dynamique de ce changement de périodicité, nous avons placé un "chopper" devant la lampe halogène, qui permet d'alterner des période d'illumination et de noir à une fréquence de 0,1 Hz, et dont l'intensité fut mesurée par une photodiode. Le changement d'espacement était en phase avec la périodicité de l'illumination, ce qui permet de conclure que cet effet est quasi-instantané (plus rapide que notre résolution temporelle qui est de l'ordre de la seconde). Cependant, la même expérience conduite sur des multilamellaire ne contenant pas la protéine, a donné des résultats similaires. Ces changements de périodicité ne sont donc pas dus à l'activité protéique, mais sont probablement des effets thermiques ou des changements d'hydratation du multilamellaire.

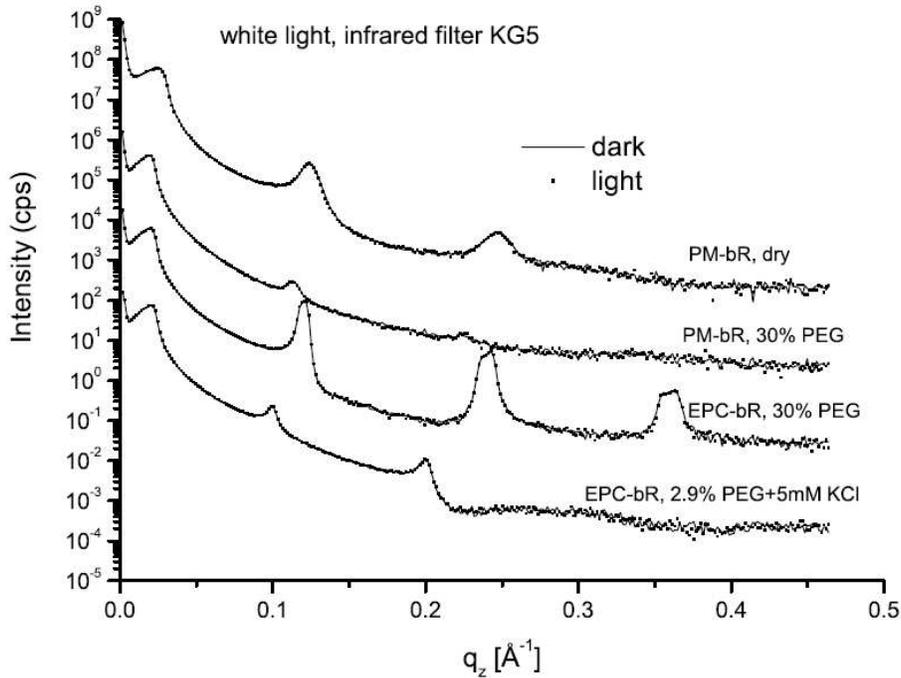
Aram Giahi a poursuivi ces expériences en changeant le filtre utilisé pour l'illumination et en coupant la partie infrarouge par un filtre anticalorique, et il a trouvé que pour une illumination :

- Rouge (transmet  $\lambda > 600nm$ ,  $d = 51,5 \text{ \AA}$ )
- Jaune (transmet  $\lambda > 500nm$ ,  $d = 51,2 \text{ \AA}$ )

On remarque que plus on élargi le spectre de la lumière utilisée, plus on augmente la quantité d'énergie injectée dans la système (modulée par les changements d'absorption des différentes longueurs d'onde), et plus le changement d'espacement augmente. Il est noté aussi que sans le rayonnement infrarouge de la lampe halogène, la variation est fortement réduite ( $d = 48,5 \text{ \AA}$  en lumière jaune avec IR,  $d = 51,2 \text{ \AA}$  en lumière jaune sans IR, ce qui confirme l'origine thermique de ces artefacts. En quantifiant la part de cet effet qui vient de la membrane et celle qui vient de la couche d'hydratation, on a remarqué que la membrane restait d'épaisseur constante ( $d_m \simeq 38 \text{ \AA}$ ), et que c'est l'épaisseur des couches d'eau qui diminuait lors de l'illumination.

Pour éviter ces artefacts thermiques, A. Giahi entrepris de mesurer la réflectivité des rayons X sur des échantillons immergés dans une solution aqueuse, qui joue le rôle de réservoir thermique. Les structures lamellaires étant instables dans une solution d'eau pure, il a ajouté des polymères PEG(20 000) pour imposer une pression osmotique sur le multilamellaire, et le stabiliser de cette façon. Il a aussi conduit des expériences identiques sur des multilamellaires de membrane pourpre (membrane native de la BR). Les résultats sont données dans la figure (D.2). On voit que non seulement l'illumination ne change pas la position des pics de Bragg dans les différentes conditions expérimentales explorées, mais que les courbes se superposent complètement. Une am-

plification de fluctuation, même si elle n'induit pas de déplacement des pics, devrait les élargir. L'absence de tout changement indique que l'amplitude des fluctuations n'est pas modifiée.



**Fig. D.2.** *Mesure de l'intensité de rayons X réfléchis en fonction de  $q_z$ , sans illumination (courbe continue), et avec illumination blanche sans rayonnement infrarouge (courbe en pointillés). Plusieurs compositions : [membrane pourpre native de la BR (PM-BR), membrane EPC contenant la BR]; et différentes conditions d'hydratation : [sec (dry), solution aqueuse de PEG(20000) à 30% en poids, et solution aqueuse de PEG(20000) à 2,9% en poids et 5 mM KCl] ont été testées. [Giahi et al., 2007]*

Ces expériences ont été réalisées sans addition d'azide de sodium qui, comme on l'a vu dans la section 6.4.6, est nécessaire à l'apparition d'effets mesurables par les expériences de micropipettes et par analyse de contours. Ces expériences sont antérieures au moment où un effet lié à l'activité de la BR a été obtenu sur les spectres de fluctuations par ajout d'azide de sodium. Il serait donc nécessaire de reconduire ce genre d'expériences dans des conditions où des effets hors équilibres ont été mesurés.



---

## Bibliographie

---

- [Alberts *et al.*, 1989] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J. (1989). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York, second édition.
- [Ambjornsson *et al.*, 2007] AMBJORNSSON, T., LOMHOLT, M. A. et HANSEN, P. L. (2007). Applying a potential across a biomembrane : Electrostatic contribution to the bending rigidity and membrane instability. *Physical Review E*, 75(5):051916.
- [Angelova *et al.*, 1992] ANGELOVA, M., SOLÉAU, S., MÉLÉARD, P., FAUCON, J. et BORTHOUREL, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 89:127–131.
- [Bacia *et al.*, 2005] BACIA, K., SCHWILLE, P. et KURZCHALIA, T. (2005). Sterol structure detremines the separation of phases and the curvature of the liquide-ordered phase in model membranes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 102(9):3272–3277.
- [Baumgart *et al.*, 2005] BAUMGART, T., DAS, S., WEBB, W. W. et JENKINS, J. T. (2005). Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.*, 89(2):1067–1080.
- [Baumgart *et al.*, 2003] BAUMGART, T., HESS, S. et WEBB, W. W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425(23 October):821–824.
- [Behnia et Munro, 2005] BEHNIA, R. et MUNRO, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438:597.
- [Birge, 1990] BIRGE, R. R. (1990). Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1096:293–327.

- [Bo et Waugh, 1989] BO, L. et WAUGH, R. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, 55:509–517.
- [Boumgart *et al.*, 2007] BOUMGART, T., HAMMOND, A. T., SENGUPTA, P., HESS, S. T., HOLOWKA, D. A. et WEBB, W. W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *PNAS*, 104:3165.
- [Brochard et Lennon, 1975] BROCHARD, F. et LENNON, J.-F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Phys.*, 36:1035–1047.
- [Brown et Rose, 1992] BROWN, D. et ROSE, J. (1992). Sorting of gpi-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 87:507.
- [Canham, 1970] CANHAM, P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 26:61–81.
- [Chen, 2004] CHEN, H.-Y. (2004). Internal states of active inclusions and the dynamics of an active membrane. *Physical Review Letters*, 92:168101–4.
- [Cladera *et al.*, 1996] CLADERA, J., RIGAUD, J.-L., BOTTIN, H. et DUNACH, M. (1996). Functional reconstitution of photosystem i reaction center from cyanobacterium *synechocystis* sp pcc6803 into liposomes using a new reconstitution procedure. *Journal of Bioenergetics and biomembranes*, 28:505–517.
- [Cuvelier, 2005] CUVELIER, D. (2005). *Adhésion cellulaire et tubes de membrane : Quelques aspects dynamiques, mécaniques et rhéologiques*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- [Cuvelier *et al.*, 2005] CUVELIER, D., DERÉNYI, I., BASSEREAU, P. et NASSOY, P. (2005). Coalescence of membrane tethers : Experiments, theory and applications. *Biophys. J.*, 88:2714.
- [Döbereiner *et al.*, 2003] DÖBEREINER, H.-G., GOMPPER, G., HALUSKA, C. K., KROLL, D. M., PETROV, P. G. et RISKE, K. A. (2003). Advanced flicker spectroscopy of fluid membranes. *Physical Review Letters*, 91:048301.
- [De-Gennes et Prost, 1993] DE-GENNES, P. G. et PROST, J. (1993). *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford : Clarendon Press.
- [Dean *et al.*, 2001] DEAN, M., HAMON, Y. et CHIMINI, G. (2001). The human atp-binding cassette (abc) transporter superfamily. *J. Lipid Res.*, 42:1007–1017.
- [Delanoe-Ayari *et al.*, 2004] DELANOE-AYARI, H., AL KURDI, R., VALLADE, M., GULINO-DEBRAC, D. et RIVELINE, D. (2004). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *PNAS*, 101:2229–2234.
- [Derényi *et al.*, 2002] DERÉNYI, I., JÜLICHER, F. et PROST, J. (2002). Formation and interaction of membrane tubes. *Physical Review Letters*, 88:238101.

- 
- [Devaux et Morris, 2004] DEVAUX, P. et MORRIS, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, 5:241.
- [Dimova *et al.*, 2006] DIMOVA, R., ARANDA, S., BEZLYEPKINA, N., NIKOLOV, V., RISKE, K. A. et LIPOWSKY, R. (2006). A practical guide to giant vesicles. probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 18:S1151–S1176.
- [Dimova et Pouligny, 2007] DIMOVA, R. et POULIGNY, B. (2007). *Methods in Molecular Biology, vol. 400 : Methods in Membrane Lipids : Optical Dynamometry to Study Phase Transition in Lipid Membranes*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [do Carmo, 1976] do CARMO, M. (1976). *Differential Geometry of Curves and Surfaces*. Prentice-Hall, New Jersey.
- [Doeven *et al.*, 2005] DOEVEN, M. K., FOLGERING, J. H. A., KRASNIKOV, V., GEERTSMA, E. R., van den BOGAART, G. et POOLMAN, B. (2005). Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 88:1134–1142.
- [Dowhan et Bogdanov, 2002] DOWHAN, W. et BOGDANOV, M. (2002). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. Elsevier.
- [Duwe *et al.*, 1990] DUWE, H.-P., KÄS, J. et SACKMANN, E. (1990). Bending elasticity moduli of lipid bilayers : modulation by solutes. *J. Phys. France*, 51:945–962. A22 Présentation de la technique expérimentale et de l'analyse (harmonique sphérique, puis coupe 2D analysée en série de Fourier, et corrélation temporelle des coefficient de la série. Rigidité de courbure de DMPC, DMPC+Cholestérol, DMPC+C5-PC.
- [Edidin, 2003] EDIDIN, M. (2003). The state of lipid rafts : From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 4:414.
- [Engelman, 2005] ENGELMAN, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438:578.
- [Evans, 1973] EVANS, E. (1973). A new material concept for the red cell membrane. *Biophys. J.*, 13:926.
- [Evans et Needham, 1987] EVANS, E. et NEEDHAM, D. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.*, 91:4219–4228.
- [Evans et Rawicz, 1990] EVANS, E. et RAWICZ, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, 64:2094–2097.
- [Faucon *et al.*, 1989] FAUCON, J., MITOV, M., MÉLÉARD, P., BIVAS, I. et BOTHOREL, P. (1989). Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, 50:2389–2414. A22 mesure du module de rigidité de courbure d'EPC grace à la méthode des harmoniques sphériques et plus précisément de la fonction d'autocorrélation angulaire. Theorie et expériences.

- [Fernandez-Puente *et al.*, 1994] FERNANDEZ-PUENTE, L., BIVAS, I., MITOV, M. et MÉLÉARD, P. (1994). Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers. *Europhys. Lett.*, 28:181–186.
- [Forge *et al.*, 1995] FORGE, V., MINTZ, E., CANET, D., et GUILLAIN, F. (1995). Lumenal  $ca^{2+}$  dissociation from the phosphorylated  $ca^{2+}$ -atpase of the sarcoplasmic reticulum is sequential. *J. Biol. Chem.*, 270:18271.
- [Fournier *et al.*, 2001] FOURNIER, J. B., AJDARI, A. et PELITI, L. (2001). Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Physical Review Letters*, 86(21):4970–4973.
- [Geibel *et al.*, 2001] GEIBEL, S., FRIEDRICH, T., ORMOS, P., WOOD, P. G., NAGEL, G. et BAMBERG, E. (2001). The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior. *Biophys. J.*, 81:2059–2068.
- [Gerbeaud, 1998] GERBEAUD, C. (1998). *Effet de l'insertion de protéines et de peptides membranaires sur les propriétés mécaniques et les changements morphologiques de vésicules géantes*. Thèse de doctorat, University Bordeaux I.
- [Giahi *et al.*, 2007] GIAHI, A., EL ALAOUI FARIS, M., BASSEREAU, P. et SالدITT, T. (2007). Active membranes studied by x-ray scattering. *Eur. Phys. J. E.*, 23:431.
- [Girard, 2004] GIRARD, P. (2004). *Membranes hors équilibre : échanges et transport actif*. Thèse de doctorat, University Paris VII.
- [Girard *et al.*, 2004a] GIRARD, P., PÉCRÉAUX, J., FALSON, P., RIGAUD, J.-L. et BASSEREAU, P. (2004a). A new method for the reconstitution of large concentrations of transmembrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 87:419–429.
- [Girard *et al.*, 2004b] GIRARD, P., PROST, J. et BASSEREAU, P. (2004b). Passive or active fluctuations in membranes containing proteins. *Physical Review Letters*, 94:088102.
- [Gittes *et al.*, 1993] GITTES, F., MICKEY, B., NETTLETON, J. et HOWARD, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.*, 120:923–934. B15.
- [Gov, 2004] GOV, N. (2004). Membrane undulations driven by force fluctuations of active proteins. *Phys. Rev. Lett.*, 93:268104.
- [Gov et Gopinathan, 2006] GOV, N. et GOPINATHAN, A. (2006). Dynamics of membranes driven by actin polymerization. *Biophysical Journal*, 90:454.
- [Gov *et al.*, 2003] GOV, N., ZILMAN, A. G. et SAFRAN, S. (2003). Cytoskeleton confinement and tension of red blood cell membranes. *Physical Review Letters*, 90:228101.
- [Granek et Pierrat, 1999] GRANEK, R. et PIERRAT, S. (1999). Enhanced transverse diffusion in active biomembranes. *Phys. Rev. Lett.*, 83:872–875.

- 
- [Haupts *et al.*, 1999] HAUPTS, U., TITTOR, J. et OESTERHELT, D. (1999). Closing in on bacteriorhodopsin : progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28:367–399.
- [Heberle et Dencher, 1992] HEBERLE, J. et DENCHER, N. (1992). Surface-bound optical probes monitor proton translocation and surface potential change during the bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5996–6000.
- [Heimburg, 1998] HEIMBURG, T. (1998). 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.
- [Heinrich et Waugh, 1996] HEINRICH, V. et WAUGH, R. (1996). A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes. *Ann. Biomed. Eng.*, 24:595.
- [Helfrich, 1973a] HELFRICH, W. (1973a). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Zur Naturforschung*, 28c:693–703.
- [Helfrich, 1973b] HELFRICH, W. (1973b). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C*, 28:693–703. A5 LE PAPIER dans lequel sont expliquées les bases théoriques du hamiltonien de Canham-Helfrich ; analogie avec les cristaux liquides. Puis suggestion d'une expérience de déformation magnétique.
- [Helfrich, 1985] HELFRICH, W. (1985). Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces. *Journal de physique*, 46:1263–1268.
- [Hénon *et al.*, 1999] HÉNON, S., LENORMAND, G., RICHERT, A. et GALLET, F. (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.*, 76:1145–1151.
- [Henriksen et Ipsen, 2002] HENRIKSEN, J. R. et IPSEN, J. H. (2002). Thermal undulations of quasi-spherical vesicles stabilized by gravity. *Eur. Phys. J. E*, 9:365–374.
- [Hochmuth *et al.*, 1973] HOCHMUTH, R., MOHANDAS, N. et P.L. BLACKSHEAR, J. (1973). Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.*, 13:747.
- [Hochmuth *et al.*, 1982] HOCHMUTH, R., WILES, H., EVANS, E. et MCCOWN, J. (1982). Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether in experiment. *Biophys. J.*, 39:83.
- [Hodgkin et Huxley, 1952] HODGKIN, A. et HUXLEY, A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117:500.
- [Israelachvili, 1992] ISRAELACHVILI, J. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, 2ème édition.

- [Jacobson *et al.*, 2007] JACOBSON, K., MOURITSEN, O. G. et ANDERSON, R. G. W. (2007). Lipid rafts : at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.*, 9:7.
- [Kahya *et al.*, 2003] KAHYA, N., SCHEFELD, D., BACIA, K., POOLMAN, B. et SCHWILLE, P. (2003). Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 278:28109.
- [Kahya *et al.*, 2002] KAHYA, N., WIERSMA, D. A., POOLMAN, B. et HOEKSTRA, D. (2002). Spatial organization of bacteriorhodopsin in model membranes. light-induced mobility changes. *J. Biol. Chem.*, 277:39304–11.
- [Kaizuka et Groves, 2006] KAIZUKA, Y. et GROVES, J. T. (2006). Hydrodynamic damping of membrane thermal fluctuations near surfaces imaged by fluorescence interference microscopy. *Phys Rev Lett*, 96:118101.
- [Kühlbrand, 2000] KÜHLBRAND, W. (2000). Bacteriorhodopsin - the movie. *Nature*, 406:569–570.
- [Koster *et al.*, 2003] KOSTER, G., VANDUIJN, M., HOF, B. et DOGTEROM, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 100:15583–15588.
- [Kouyama *et al.*, 1985] KOUYAMA, T., BOGOMOLNI, R. et STOECKENIUS, W. (1985). Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 48:201–208.
- [Kwok et Evans, 1981] KWOK, R. et EVANS, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 35:637–652.
- [Lacoste *et al.*, 2007] LACOSTE, D., COSENTINO-LAGOMARSINO, M. et JOANNY, J. F. (2007). Fluctuations of a driven membrane in an electrolyte. *Europhys. Lett.*, 77:18006.
- [Lacoste et Lau, 2005] LACOSTE, D. et LAU, A. W. C. (2005). Dynamics of active membranes with internal noise. *Europhys. Lett.*, 70:418.
- [Lambacher et Fromherz, 1996] LAMBACHER, A. et FROMHERZ, P. (1996). Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Applied Physics A : Materials Science & Processing*, 63:207.
- [Leduc *et al.*, 2004] LEDUC, C., CAMPAS, O., ZELDOVICH, C., ROUX, A., JOLIMAITRE, P., L. BOUREL-BONNET, L., GOUD, B., JOANNY, J. F., BASSEREAU, P. et PROST, J. (2004). Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors. *PNAS*, 101:17096.
- [Lee *et al.*, 2001] LEE, C. H., LIN, W. C. et WANG, J. (2001). All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Phys. Rev. E*, 64:020901.

- [Lee et Wang, 1997] LEE, C. H. et WANG, J. (1997). Noninterferometric differential confocal microscopy with 2-nm depth resolution. *Optics Communications*, 135:233–237.
- [Leibler et Andelman, 1987] LEIBLER, S. et ANDELMAN, D. (1987). Ordered and curved meso-structures in membranes and amphiphilic films. *J. Phys.*, 48:2013–2018.
- [Levy et al., 1990] LEVY, D., SEIGNEURET, M., BLUZAT, A. et RIGAUD, J. L. (1990). Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -atpase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J. Biol. Chem.*, 265:19524.
- [Lin et al., 2006] LIN, L. C. L., GOV, N. et BROWN, F. L. H. (2006). Nonequilibrium membrane fluctuations driven by active proteins. *The Journal of Chemical Physics*, 124:074903.
- [Lingwood et Simons, 2007] LINGWOOD, D. et SIMONS, K. (2007). Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nature Protocols*, 2:2159.
- [Lipowsky et Sackmann, 1995] LIPOWSKY, R. et SACKMANN, E., éditeurs (1995). *Structure and dynamics of membranes : from cells to vesicles*. Elsevier.
- [Lippincott-Schwartz et al., 2000] LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., ROBERTS, T. et HIRSCHBERG, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16:557.
- [Lodish et al., 2003] LODISH, BERK, MATSUDAIRA, KAISER, KRIEGER, SCOTT, ZIPURSKY et DARNELL (2003). *Molecular Cell Biology, 5th edition*. W H Freeman & Co.
- [Lomholt, 2006a] LOMHOLT, M. (2006a). Fluctuation spectrum of quasispherical membranes with force-dipole activity. *Physical Review E*, 73:061914.
- [Lomholt, 2006b] LOMHOLT, M. (2006b). Mechanics of nonplanar membranes with force-dipole activity. *Physical Review E*, 73:061913.
- [Lomholt et al., 2005] LOMHOLT, M. A., HANSEN, P. L. et MIAO, L. (2005). A general theory of non-equilibrium dynamics of lipid-protein fluid membranes. *Eur. Phys. J. E*, 16:439.
- [Luecke et al., 1999] LUECKE, H., SCHOBERT, B., RICHTER, H.-T., CARTAILLER, J. et LANYI, J. (1999). Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolutions. *Science*, 286:255–260.
- [Luisi, 2006] LUISI, P. L. (2006). *The Emergence of Life : From Chemical Origins to Synthetic Biology*. Cambridge University Press.
- [MacLennan et al., 1985] MACLENNAN, D., BRANDL, C., KORCZAK, B. et GREEN, N. (1985). Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent atpase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary dna sequence. *Nature*, 316:696.

- [Madigan *et al.*, 1997] MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. et PARKER, J. (1997). *Biology of microorganisms*. Pernetice Hall International Inc., 8th édition.
- [Maingret *et al.*, 1999a] MAINGRET, F., FOSSET, M., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. et HONORE, E. (1999a). TRAAK Is a Mammalian Neuronal Mechano-gated K<sup>+</sup> Channel. *J. Biol. Chem.*, 274(3):1381–1387.
- [Maingret *et al.*, 1999b] MAINGRET, F., PATEL, A. J., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M. et HONORE, E. (1999b). Mechano- or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, 274(38):26691–26696.
- [Manneville, 1999] MANNEVILLE, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives*. Thèse de doctorat, University Paris VII.
- [Manneville *et al.*, 1999] MANNEVILLE, J.-B., BASSEREAU, P., LEVY, D. et PROST, J. (1999). Activity of transmembranes proteins induces magnification of shape fluctuations of lipid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 82:4356–4359.
- [Manneville *et al.*, 2001] MANNEVILLE, J.-B., BASSEREAU, P., RAMASWAMY, S. et PROST, J. (2001). Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Phys. Rev. E*, 64:021908.
- [Mathivet *et al.*, 1996] MATHIVET, L., CRIBIER, S. et DEVAUX, P. F. (1996). Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an ac electric field. *Biophys. J.*, 70:1112–1121.
- [McMahon et Gallop, 2005] MCMAHON, H. T. et GALLOP, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438:590.
- [Meder *et al.*, 2006] MEDER, D., MORENO, M. J., VERKADE, P., VAZ, W. L. C. et SIMONS, K. (2006). Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. *PNAS*, 103:329.
- [Mennicke *et al.*, 2006] MENNICKE, U., CONSTANTIN, D. et SALDITT, T. (2006). Structure and interaction potentials in solid-supported lipid membranes studied by x-ray reflectivity at varied osmotic pressure. *Eur. Phys. J. E*, 20:221.
- [Michalet, 1994] MICHALET, X. (1994). *Etudes expérimentales de vésicules phospholipidiques de genre topologique non sphérique*. Thèse de doctorat, Université Paris 7.
- [Méléard *et al.*, 1998] MÉLÉARD, P., GERBEAUD, C., BARDUSCO, P., JEANDAINÉ, N., MITOV, M. et FERNANDEZ-PUENTE, L. (1998). Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie*, 80:401–413. A22.
- [Mohandas et Evans, 1994] MOHANDAS, N. et EVANS, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. rev. biophys. biophys. chem.*, 23:787.

- [Mutz et Helfrich, 1990] MUTZ, M. et HELFRICH, W. (1990). Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the fourier analysis of contour sections. *J. Phys.*, 51:991–1002. A16 Sur des morceaux de membranes plans issues d'une pousse spontanée, mesure des coefficients de Fourier discret. Analyse en terme de courbure uniquement. Néglige les effets de tension et d'intégration en temps dues à la caméra.
- [Noireaux *et al.*, 2005] NOIREAUX, BAR-ZIV, GODEFROY, SALMAN et LIBCHABER (2005). Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles. *Physical Biology*, 2:1.
- [Odermatt *et al.*, 1996] ODERMATT, A., TASCHNER, P. E. M., KHANNA, V. K., BUSCH, H. F. M., KARPATI, G., JABLECKI, C. K., BREUNING, M. H. et MACLENNAN, D. H. (1996). Mutations in the gene-encoding *serca1*, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $ca^{2+}$  atpase, are associated with brody disease. *Nat. Genet.*, 14:191.
- [Oesterhelt et Tittor, 1989] OESTERHELT, D. et TITTOR, J. (1989). Two pumps, one principle : light-driven ion transport in halobacteria. *TIBS*, 14:57–61.
- [Olbrich *et al.*, 2000] OLBRICH, K., RAWICZ, W., NEEDHAM, D. et EVANS, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Bio-phys. J.*, 79:321–327.
- [Ormos *et al.*, 1997] ORMOS, P., DÉR, A., GERGELY, C., KRUSKA, S., SZÁRAZ, S. et TOKAJI, Z. (1997). The effect of azide on the photocycle of bacteriorhodopsin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 40:111.
- [Pécéréaux, 2004] PÉCRÉAUX, J. (2004). *Mesure du spectre de fluctuations de vésicules géantes par analyse de contours : application aux membranes passives et actives*. Thèse de doctorat, Université Paris 6.
- [Pécéréaux *et al.*, 2004] PÉCRÉAUX, J., DÖBEREINER, H.-G., PROST, J., JOANNY, J.-F. et BASSEREAU, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur. Phys. J. E*, 13:277–290.
- [Pishvae et Payne, 1998] PISHVAEE, B. et PAYNE, G. (1998). Clathrin coats - threads laid bare. *Cell*, 95:443.
- [Pollard, 2003] POLLARD, T. D. Borisov, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112:453.
- [Popescu *et al.*, 2006] POPESCU, G., IKEDA, T., GODA, K., BEST-POPESCU, C. A., LAPOSATA, M., MANLEY, S., DASARI, R. R., BADIZADEGAN, K. et FELD, M. S. (2006). Optical measurement of cell membrane tension. *Physical Review letters*, 97:218101.
- [Porschke, 2003] PORSCHKE, D. (2003). Strong bending of purple membranes in the m-state. *Journal of Molecular Biology*, 331(3):667–79.

- [Powers *et al.*, 2002] POWERS, T., HUBER, G. et GOLDSTEIN, R. (2002). Fluid-membrane tethers : Minimal surfaces and elastic boundary layers. *Physical Review E*, 65:041901.
- [Prost et Bruinsma, 1996] PROST, J. et BRUINSMA, R. (1996). Shape fluctuations of active membranes. *Europhysics Letters*, 33(4):321–326.
- [Prost *et al.*, 1998] PROST, J., MANNEVILLE, J.-B. et BRUINSMA, R. (1998). Fluctuation-magnification of non-equilibrium membranes near a wall. *The European Physical Journal B*, 1:465–480.
- [Ramaswamy *et al.*, 2000] RAMASWAMY, S., TONER, J. et PROST, J. (2000). Nonequilibrium fluctuations, travelling waves and instabilities in active membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 84(15):3494–3497. A1 Théorie des membranes actives avec couplage courbure diffusion (la théorie), mais pas encore avec le dipôle de force hydrodynamique.
- [Rawicz *et al.*, 2000] RAWICZ, W., OLBRICH, K. C., MCINTOSH, T., NEEDHAM, D. et EVANS, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, 79:328–339.
- [Rädler et Sackmann, 1993] RÄDLER, J. et SACKMANN, E. (1993). Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France*, 3:727.
- [Rothman, 1977] ROTHMAN, J. Lenard, J. (1977). Membrane asymetry. *Science*, 195:743.
- [Ruth-Montes *et al.*, 2007] RUTH-MONTES, L., ALONSO, A., GONI, F. M. et BAGATOLLI, L. A. (2007). Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions. *Biophys. J.*, 93:3548–3554.
- [Sakuntabhai *et al.*, 1999] SAKUNTABHAI, A., RUIZ-PEREZ, V., CARTER, S., JACOBSEN, N., BURGE, S., MONK, S., SMITH, M., MUNRO, C. S., O'DONOVAN, M., CRADDOCK, N., KUCHERLAPATI, R., REES, J. L., OWEN, M., LATHROP, G. M., MONACO, A. P., STRACHAN, T. et HOVNANIAN, A. (1999). Mutations in *atp2a2*, encoding a  $ca^{2+}$  pump, cause darier disease. *Nat. Genet.*, 21:271.
- [Sandre *et al.*, 1999] SANDRE, O., MOREAUX, L. et BROCHARD-WYART, F. (1999). Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 96:10591–10596.
- [Sankararaman *et al.*, 2002] SANKARARAMAN, S., MENON, G. et KUMAR, S. (2002). Two-component fluid membranes near repulsive walls : Linearized hydrodynamics of equilibrium and nonequilibrium states. *Physical Review E*, 66:031914.
- [Schneider *et al.*, 1984] SCHNEIDER, M. B., JENKINS, J. T. et WEBB, W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Phys.*, 45:1457–1472. A22 Article décrivant la technique qu'ils utilisent et le background

- théorique derrière. Reco de contour par technique assez basique (8 points, calcul des fonctions d'autocorrelation en temps), puis analyse en harmonique sphériques.
- [Seifert, 1993] SEIFERT, U. (1993). Dynamics of a bound membrane. *Phys. Rev. E*, 49:3127.
- [Seifert, 1997] SEIFERT, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics*, 46:13–137.
- [Sens et Isambert, 2002] SENS, P. et ISAMBERT, H. (2002). Undulation instability of lipid membranes under an electric field. *Phys. Rev. Lett.*, 88(12):128102.
- [Shechter, 1993] SHECHTER, E. (1993). *Biochimie et biophysique des membranes*. Masson, 2ème édition.
- [Simon et Ikonen, 1997] SIMON, K. et IKONEN, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387:569.
- [Singer et Nicolson, 1972] SINGER, S. J. et NICOLSON, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720.
- [Sprong *et al.*, 2001] SPRONG, H., Van der SLUIJS, P. et VAN MEER, G. (2001). How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:504.
- [Steinhoff *et al.*, 1999] STEINHOFF, H.-J., PFEIFFER, M., RINK, T., BURLON, O., KURZ, M., RIESLE, J., HEUBERGER, E., GERWERT, K. et OESTERHELT, D. (1999). Azide Reduces the Hydrophobic Barrier of the Bacteriorhodopsin Proton Channel. *Biophys. J.*, 76:2702–2710.
- [Subramaniam, 1999] SUBRAMANIAM, S. (1999). The structure of bacteriorhodopsin : an emerging consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:462–468.
- [Sudbrak *et al.*, 2000] SUDBRACK, R., BROWN, J., DOBSON-STONE, C., CARTER, S., RAMSER, J., WHITE, J., HEALY, E., DISSANAYAKE, M., LARREGUE, M., PERRUSEL, M., LEHRACH, H., MUNRO, C., STRACHAN, T., BURGE, S., HOVNANIAN, A., et MONACO, A. (2000). Hailey-hailey disease is caused by mutation in atp2c1 encoding a novel ca<sup>2+</sup> pump. *Hum. Mol. Genet.*, 9:1131.
- [Svetina *et al.*, 1998] SVETINA, S., ZEKS, B., WAUGH, R. et RAPHAEL, R. (1998). Theoretical analysis of the effect of the transbilayer movement of phospholipid molecules on the dynamic behavior of a microtubule pulled out of an aspirated vesicle. *Eur. Biophys. J.*, 27:197.
- [Tamm et Kalb, 1993] TAMM, L. K. et KALB, E. (1993). *Microspectrofluorometry on supported planar membranes*. In *Molecular Luminescence Spectroscopy, Part 3*. John Wiley and Sons, New York.
- [Tittor *et al.*, 1989] TITTOR, J., SOELL, C., OESTERHELT, D., BUTT, H. J. et BAMBERG, E. (1989). A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin asp96—asn is fully reactivated by azide. *EMBO J.*, 8:3477.

- [Toyoshima *et al.*, 2000] TOYOSHIMA, C., NAKASAKO, M., NOMURA, H. et OGAWA, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 [angst] resolution. *Nature*, 405:647.
- [Toyoshima et Nomura, 2002] TOYOSHIMA, C. et NOMURA, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418:605.
- [Waugh, 1982] WAUGH, R. (1982). Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. *Biophys. J.*, 38:19–37.
- [Wong et Groves, 2002] WONG, A. P. et GROVES, J. T. (2002). Molecular topography imaging by intermembrane fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:14147–52.