HAL
open science

Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques

Claire François-Martin

To cite this version:

Claire François-Martin. Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066160 . tel-01402000

HAL Id: tel-01402000

https://theses.hal.science/tel-01402000v1

Submitted on 24 Nov 2016

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.

Laboratoire de Physique Statistique

de l'École Normale Supérieure

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité Physique

présentée par Claire François-Martin

Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques

sous la direction de Frédéric Pincet

soutenue le 8 avril 2016, devant le jury composé de :

Cathy jackson	Rapportrice
Iván López montero	Rapporteur
Bruno antonny	Examinateur
Sophie cribier	Examinatrice
James E. rothman	Examinateur
Joshua zimmerberg	Examinateur
Frédéric pincet	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier Frédéric Pincet, sous la direction duquel ce travail a été réalisé. J'ai particulièrement apprécié la confiance qu'il m'a toujours témoignée, et la façon dont il m'a laissée mener ce projet comme je l'entendais, tout en étant disponible pour m'orienter lorsqu'il le fallait. Je le remercie aussi pour son indulgence, lorsqu'il savait pertinemment que les manips que je voulais entreprendre n'allaient pas aboutir, mais qu'il sentait qu'il fallait que j'aille au bout, que j'essaye car, au fond, c'est peut-être comme cela qu'on apprend...

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Abdou Rachid Thiam, qui m'a si souvent « éclairée » de ses lumières, et m'a permis de prendre du recul, aux moments où je m'égarais. J'apprécie spécialement sa rigueur et la façon dont il s'efforce constamment d'expliquer tout phénomène en revenant toujours au strict minimum de concepts.

Ce travail doit également beaucoup à David Tareste, avec qui j'ai eu, à de nombreuses reprises, de longs échanges qui ont nourri mes recherches et mes réflexions. Je l'en remercie sincèrement.

J'exprime également toute ma gratitude à James E. Rothman, dont les conseils aux réunions de laboratoire avec Yale ont toujours été précieux et qui m'a accueillie dans son laboratoire pendant trois mois.

Enfin, je remercie sincèrement Bruno Antonny, avec qui les discussions aux diverses conférences où nous nous sommes rencontrés ont toujours été très enrichissantes et stimulantes.

Je remercie également, bien entendu, Christine Gourier, Wladimir Urbach, Éric Perez et Bertrand Ducos pour les discussions enrichissantes à l'heure du déjeuner, leurs conseils tout au long de ma thèse, leur aide pour les répétitions orales de thèse et de conférence, et même les débats politiques.

Je remercie également Patrick Fuchs et Amélie Bacle pour les résultats de simulation qu'ils ont obtenus et pour les échanges que nous avons eus, Daniel Lévy et Aurélie Di Cicco de m'avoir permis d'observer mes échantillons en cryo-microscopie électronique dans leur laboratoire et Nicolas Taulier pour son aide avec la DLS.

J'exprime ma gratitude à Éric Perez et Jorge Kurchan, de m'avoir accueillie au Laboratoire de Physique Statistique de l'École Normale Supérieure, et remercie Marie Gefflot, Annie Ribaudeau, Benoît Paulet et Nora Sadaoui, pour leur humour et gentillesse dans leur aide face aux démarches administratives, ainsi que Zaire Dissi pour sa précieuse aide avec les ordinateurs...

Je remercie Bruno Antonny, Sophie Cribier, Cathy Jackson, Iván López Montero, Frédéric Pincet, James E. Rothman, et Joshua Zimmerberg d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir nourri de leurs sciences les réflexions lors de ma soutenance.

J'adresse en particulier mes sincères remerciements à Cathy Jackson et à Iván López Montero qui ont bien voulu être les rapporteurs de mon travail, et ainsi apporter deux regards complémentaires à celui-ci.

Je remercie enfin tous les membres de l'équipe LPS, Kévin, Jérôme, Jim, Andrea, Ksenia, Vladimir, Myriam, Benjamin, Clémence, Hélène, Dalila, Kalthoum, Sathish, Nabor, Frédéric, Éric, Christine, Rachid et Wladimir pour la bonne humeur générale au labo.

Je remercie particulièrement Benjamin, Isabelle et Kévin, qui se sont avérés être bien plus que des collègues. Je me rappellerai longtemps des manips à la lampe frontale avec Benjamin, lorsqu'il « pleuvait » au labo à cause des travaux et que l'électricité avait été court-circuitée, et des pauses grenadines et pains au chocolat pour oublier, des chocolats chauds et des répétitions de théâtre avec Isabelle, et des pauses-balades avec Kévin dans la rue (ou sur les toits !) et, bien entendu, des moments où, tous les quatre déguisés en spermatozoïdes, nous tentions d'expliquer le sujet de thèse de Benjamin en tournant *Rencontre fusionnelle* dans le cadre du festival *Les chercheurs font leur cinéma*.

Je souhaite finalement remercier tous ceux qui m'ont soutenue pendant mes périodes de doutes, et avec qui j'ai passé de précieux moments le reste du temps, Fanny, Victor, Martin, Camille, Apolline, Isaline, Charles, Charlotte, François, Marie-Cécilia, Quentin, Maud, Anne-Lise, Corinne, Didier, Juliette, Pol-Alain, Alexandre, Marine, Lennie, Roxanne, Raphaël, et en particulier Paul, et Thomas, Zoé et Ambre. C'est vrai que l'amitié double les joies et réduit la moitié des peines ! Et c'est aussi à eux que je dois ce travail !

Enfin, je suis d'une infinie reconnaissance à mon frère, ma sœur et ma mère, de m'avoir soutenue (et supportée !) pendant ces années, dans les moments de doutes et de découragements. Je leur dois beaucoup, et ce travail aussi.

Sommaire

Introduction **1**

1 Généralités sur les lipides et les membranes **3**

1 Les lipides, constituants des membranes biologiques 5

1 .1 Les lipides, des molécules amphiphiles 7

1 .2 Classification des lipides structurels 13

1 .3 Transition de phase des lipides 17

2 Membranes lipidiques artificielles 19

2 .1 Modèles de bicouches lipidiques 20

2 .2 Classification des liposomes 21

2 Fusion membranaire et aspects énergétiques **24**

1 Théorie et simulations 26

1 .1 Approche théorique 27

1 .2 Simulations informatiques 30

2 Étapes théoriques de la fusion 31

2 .1 Approche des membranes et répulsion d'hydratation 32

2 .2 Approche localisée des bicouches 33

2 .3 Conformation étendue des lipides 35

2 .4 Du *stalk* à l'ouverture du pore de fusion 36

3 Complexité d'une étude énergétique 40

3 .1 Impact de certains paramètres sur la fusion 41

3 .2 Estimations énergétiques diverses 46

3 .3 Nécessité de l'approche expérimentale 48

3 Principe de l'étude **50**

1 Mise en évidence expérimentale de la fusion membranaire 50

1 .1 FRET et auto-extinction de fluorescence 51

1 .2 Suivi du mélange de lipides par le FRET 54

1 .3 Distinction entre fusion et autres types de partage de lipides 55

2 Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion 59

2 .1 Mouvement brownien et loi d'Arrhenius 60

2 .2 Détermination de l'énergie d'activation 62

4 Quantification des vitesses de fusion **65**
1 Acquisition des données 65
1 .1 Protocole expérimental 65
1 .2 Estimation de la vitesse de fusion 68
2 Vitesse de fusion *normalisée*, comparable à toutes les températures 70
2 .1 Normalisation par solubilisation des lipides 71
2 .2 Diminution du FRET par dilution des lipides 76

5 Énergie d'activation de fusion du POPC **83**
1 Choix de la concentration de travail 83
2 Détermination de la taille des vésicules 87
2 .1 Mesure par diffusion de lumière 87
2 .2 Mesure par microscopie électronique 88
3 Caractérisation du type de mélange de lipides 89
3 .1 Mise en évidence de la fusion complète 90
3 .2 Quantification de la fraction de fusion complète 94
4 Estimation de l'énergie d'activation 99

6 Étude énergétique de systèmes plus complexes **102**
1 Fusion de membranes composées de lipides cylindriques 102
1 .1 Énergie d'activation du DOPC 103
1 .2 Comparaison de la fusion du DOPC et du POPC 104
2 Influence des lipides à courbure négative sur la fusion 106
2 .1 Énergie d'activation de fusion de membranes contenant du PE . . . 107
2 .2 Étude de l'impact de l'ajout de PE sur la fusion 109

7 Vers un système plus physiologique... **116**

Conclusion **121**

A Préparation des LUV **123**

B Évolution du modèle du *stalk* **125**

C Artéfacts potentiels liés au changement de température **127**

D Estimation de la pente de la courbe **131**

E Diffusion dynamique de la lumière **133**

F Cryo-microscopie électronique **135**

G Estimation de la fraction de DOPE située dans le feuillet interne **136**

H Énergie d'activation de la fusion de MP_{int}-VS_{ext} **138**

Bibliographie **140**

Introduction

La majorité des organismes vivants sont composés de compartiments, délimités par une membrane, et ayant chacun leur fonction propre. Ainsi, l'unité de base du vivant, la cellule, est séparée du milieu extracellulaire par sa membrane plasmique. Une compartimentation similaire est retrouvée au sein même des cellules eucaryotes, où un réseau de membranes délimite les structures spécialisées de la cellule, les organelles. Cette organisation assure aussi bien l'intégrité structurelle que fonctionnelle des différentes entités.

Néanmoins, les différents compartiments doivent impérativement communiquer entre eux pour participer à des processus plus globaux, et assurer le bon fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Cette communication repose généralement sur le transport intracellulaire de vésicules pouvant bourgeonner de compartiments « donneurs » et aller fusionner avec des compartiments « receveurs » afin de leur livrer leurs contenus. La fusion de la membrane de la vésicule avec celle du compartiment « receveur » est une des étapes cruciales de ce processus.

De nombreux autres processus reposent, eux aussi, sur la fusion membranaire. Dans le cas de la fécondation, par exemple, la communication s'opère par la fusion directe des membranes des deux compartiments, permettant ainsi aux matériels génétiques du spermatozoïde et de l'ovule d'être mis en commun. C'est également le cas lors de certaines infections virales, où l'enveloppe du virus fusionne avec la membrane plasmique de la cellule hôte pour l'infecter.

Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes sous-jacents à la fusion membranaire, aussi bien dans le cadre de la recherche fondamentale qu'en vue d'éventuelles applications thérapeutiques.

Les membranes biologiques sont des entités stables. En effet, leur matrice est formée par une bicouche de lipides, qui s'assemblent ainsi spontanément lorsqu'ils sont en milieu aqueux. De cette propriété découle que la fusion membranaire, nécessitant la perturbation de cet état d'équilibre, requiert un apport d'énergie. Cela prévient le risque de fusion anarchique, de façon à ce que l'intégrité des compartiments soit préservée. La fusion est donc généralement déclenchée et régulée par de multiples protéines, les échanges d'information pouvant ainsi se dérouler en temps et en lieux requis.

La quantité exacte d'énergie nécessaire à la fusion membranaire demeure inconnue. Diverses études théoriques et simulations numériques ont été réalisées et prédisent des valeurs comprises entre 20 et 150 k_BT. Cependant, à notre connaissance, aucune étude expérimentale complète n'en a été effectuée à ce jour.

Dans cette étude, nous avons choisi de nous focaliser sur la fusion de membranes exclusivement lipidiques. En effet, même si les membranes biologiques ne sont pas purement lipidiques, et si la fusion biologique est un phénomène bien plus complexe induit par des protéines, son résultat est bien la coalescence des deux bicouches lipidiques. L'utilisation d'un système modèle offre donc la possibilité de progresser sur la connaissance de la fusion membranaire, tout en ayant un système parfaitement contrôlé et modulable à souhait.

Pour déterminer l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques, les fréquences des très rares événements de fusion spontanée survenant entre nos membranes modèles sont comparées à différentes températures. Cela permet de remonter à l'énergie d'activation, grâce à la loi d'Arrhenius.

Les trois premiers chapitres sont introductifs. Le premier porte sur les membranes biologiques et les lipides ; le deuxième, sur la fusion membranaire des points de vue topologique et énergétique ; et le troisième détaille les façons dont la fusion membranaire est mise en évidence dans notre étude, et dont l'énergie d'activation est déduite de l'étude de sa cinétique à différentes températures.

La suite de ce manuscrit porte sur les résultats. Le quatrième chapitre décrit comment nous quantifions les vitesses de fusion spontanée. Le cinquième chapitre présente les premiers résultats d'énergie d'activation, obtenus pour des membranes lipidiques très simples. Des compositions lipidiques plus complexes sont ensuite étudiées dans le sixième chapitre. Enfin, le septième chapitre expose les résultats obtenus pour la fusion asymétrique de vésicules, mimant d'un côté la membrane plasmique du neurone et, de l'autre, celle de la vésicule synaptique, modélisant ainsi une des étapes clés de la neurotransmission.

Chapitre 1

Généralités sur les lipides et les membranes

Qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires, la majorité des organismes vivants sont compartimentés. Plusieurs échelles d'organisation structurent de façon évidente les organismes pluricellulaires (organes, tissus et cellules). À l'intérieur même des cellules, lorsque celles-ci sont eucaryotes, on retrouve également une compartimentation avec l'existence de structures spécialisées appelées « organelles » (cf Figure 1.1).

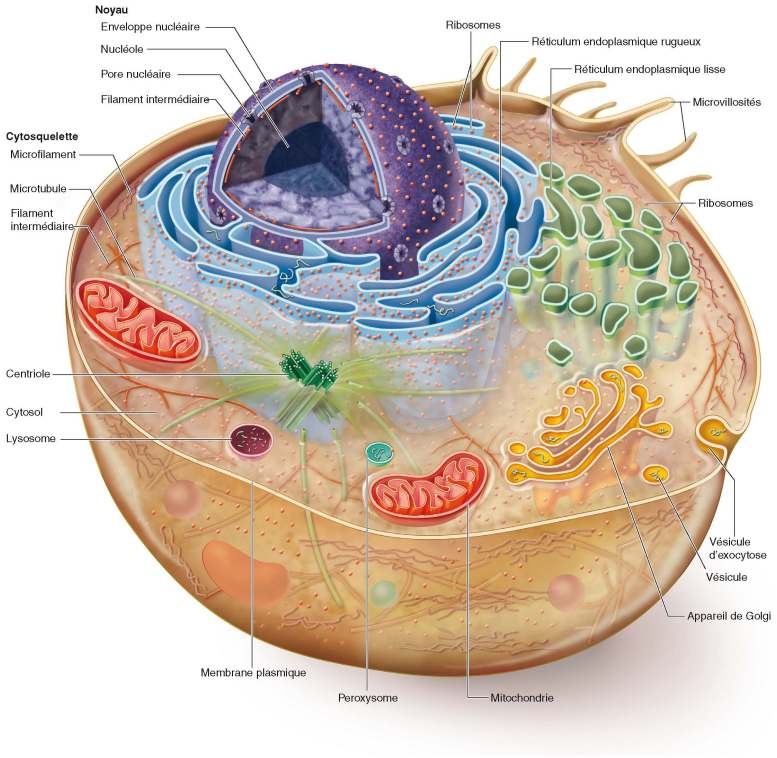


FIGURE 1.1 – **Représentation schématique d'une cellule eucaryote**. La cellule est séparée du milieu extracellulaire par sa membrane plasmique. Dans le cytoplasme de la cellule se trouvent de nombreuses organelles, délimitées par une membrane et ayant une fonction propre. À titre d'exemple, les mitochondries produisent l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) dont la cellule se sert comme énergie chimique. Les lysosomes sont responsables de la digestion cellulaire. *Figure extraite de Biologie, Raven et al., (2011), De Boeck Université.*

Une telle compartimentation est possible grâce à l'existence des membranes biologiques. La cellule est séparée du milieu extérieur par une membrane dite « membrane plasmique » et, d'une façon similaire, d'autres membranes délimitent les organelles à l'intérieur de la cellule. Elles ne sont pas toutes constituées exactement de la même façon (composition, forme, *etc.*) mais possèdent de nombreuses caractéristiques communes (cf Figure 1.2), à commencer par leur épaisseur - très fine par rapport aux dimensions de la cellule - et leur rôle de barrière.

Chez les eucaryotes, la compartimentation est vitale. Néanmoins, pour assurer le bon fonctionnement de la cellule et de l'organisme, les différentes entités ne sont pas isolées et sont amenées à interagir entre elles et avec leur environnement. Si l'existence de membranes est nécessaire à la séparation physique de certains compartiments, celles-ci ne peuvent cependant pas se comporter comme des barrières isolantes et figées, de façon à permettre de telles interactions.

Ainsi, la caractéristique principale d'une membrane biologique est de présenter une perméabilité sélective aux molécules et aux ions. L'existence de canaux et de pompes ioniques [1] permet à la cellule ou à l'organelle de gérer les flux de sels entrants et sortants, afin de contrôler sa composition propre, qui peut différer de celle du milieu environnant.

Ces structures ne permettent pas l'échange de grandes particules à travers la membrane. Heureusement, cette dernière n'est pas figée et peut se déformer pour permettre à la cellule d'échanger de grandes particules avec le milieu externe. Le mécanisme d'endocytose consiste en une invagination de la membrane à l'intérieur de la cellule, enfermant ainsi une particule afin de l'y faire pénétrer. Lorsqu'une vésicule intracellulaire fusionne avec la membrane plasmique pour externaliser une particule, on parle d'exocytose. Ces deux processus impliquent un changement de topologie de la membrane et nécessitent de ce fait une certaine déformabilité de celle-ci.

C'est aussi grâce à cette déformabilité que la cellule et l'organelle peuvent se mouvoir ou changer de forme.

Les membranes régulent également des flux d'informations en reconnaissant certaines molécules au niveau de récepteurs membranaires, en particulier des hormones, ou en envoyant des signaux chimiques ou électriques vers d'autres cellules.

Les membranes sont donc loin d'être uniquement des barrières figées et inertes et elles jouent un rôle primordial dans le monde vivant.

Dans ce chapitre, nous nous pencherons, dans un premier temps, sur la composition des membranes biologiques, et en particulier sur les lipides qui la constituent et leur comportement en milieu aqueux.

Ensuite, nous nous focaliserons sur les membranes artificielles et les systèmes modèles membranaires développés et utilisés par la communauté scientifique.

1. Les canaux ioniques peuvent accélérer les passages d'ions qui se feraient naturellement (dans le sens du gradient de concentration) mais ne peuvent pas les transporter dans le sens inverse, contrairement aux pompes qui utilisent de l'énergie pour générer un transport actif.

1 Les lipides, constituants des membranes biologiques

Les membranes biologiques sont majoritairement composées de lipides, de protéines et de sucres (cf Figure 1.2). Leurs proportions respectives varient d'un type cellulaire à l'autre. À titre d'exemple, 40% de la masse de la membrane des globules rouges provient des lipides, 8% des sucres et 52% des protéines [1].

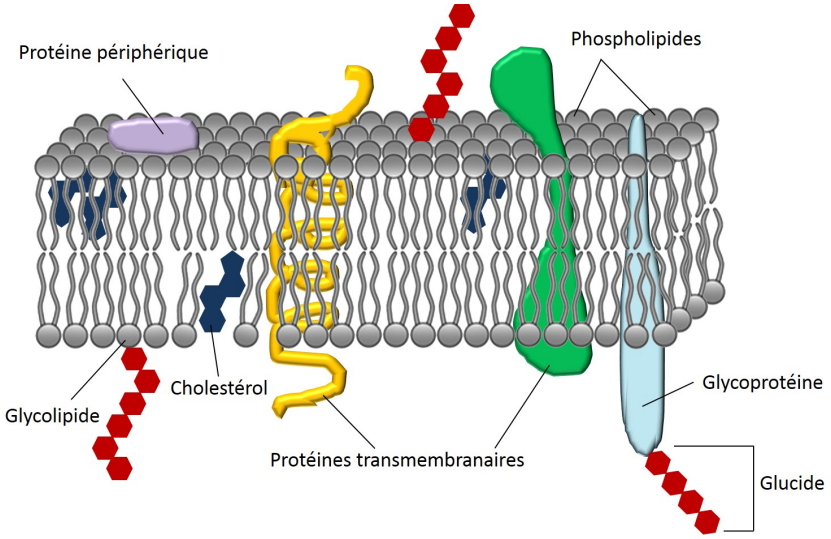


FIGURE 1.2 – **Représentation schématique d'une membrane biologique**. Les membranes peuvent être représentées comme une bicouche de phospholipides dans laquelle sont ancrées des protéines et des sucres. De manière générale, on a l'habitude de considérer que les lipides confèrent leur rôle de « barrière » à la membrane, tandis que les protéines sont responsables des fonctions spécifiques accomplies par celle-ci. Les interactions lipide(s)/protéine(s) sont, en réalité, primordiales et les rôles respectifs des lipides et des protéines ne sont donc pas aussi clairement définis.

En 1972, Singer et Nicholson décrivent, grâce à leur modèle de « mosaïque fluide » [2], les membranes biologiques comme une bicouche de lipides dans laquelle sont ancrées des protéines, qui y diffusent librement, et sont donc réparties de façon aléatoire. Les échanges de protéines entre les deux feuillets de la membrane sont, en revanche, très limités, assurant ainsi une distribution asymétrique des protéines entre les deux monocouches.

Cette description est encore très proche de notre compréhension actuelle des membranes même si nous savons maintenant que celles-ci présentent une structure bien plus complexe.

Tout d'abord, de la même façon que l'avaient suggéré Singer et Nicholson pour les protéines, les lipides ne sont pas non plus répartis de façon symétrique entre les monocouches [3]. De plus, sur un même feuillet, ces derniers ne forment pas une solution homogène : il peut exister des domaines de compositions lipidiques différentes [4] pouvant présenter des fluidités différentes.

Certaines protéines peuvent se lier préférentiellement à certains de ces domaines [5]. Elles ne diffusent donc pas totalement librement dans une « mer » de lipides, comme on le pensait à l'origine. Une monocouche aurait donc, elle aussi, une répartition hétérogène de protéines à sa surface.

À cela, il est important d'ajouter que la proportion de protéines est bien plus importante qu'on ne le pensait [6]. À titre d'exemple, la masse des protéines est environ deux fois plus élevée que la masse des lipides, dans le cas d'une vésicule synaptique [7]. On ne peut donc plus considérer la membrane comme une solution diluée de protéines dans le solvant fluide constitué par les lipides. Par conséquent, l'aspect « mosaïque » du modèle de Singer et Nicholson s'avère encore plus crucial que prédit initialement.

Enfin, le rôle de l'eau environnant la bicouche n'est pas négligeable. Certaines molécules d'eau sont très fortement liées à la surface de la membrane. Pour une bicouche typique, l'équivalent de 20% de la masse de la membrane est ajouté à cette dernière sous forme d'eau liée à la bicouche [8]. Cette eau ne gèle pas à 0°C [8], ce qui montre à quel point elle interagit avec la bicouche.

Pour résumer, la matrice de la membrane est formée par une bicouche de lipides, dans laquelle sont ancrés des sucres et des protéines (cf Figure 1.2). La diversité des lipides est très importante [9] et ils ne sont ni répartis de façon homogène entre les deux monocouches [3], ni sur un feuillet lui-même [4]. Le rôle de barrière de la membrane est souvent attribué à la bicouche lipidique, tandis que l'on confère les fonctions plus spécifiques et actives aux protéines, et les rôles de protection et de reconnaissance aux sucres. Néanmoins, les interactions lipide(s)-protéine(s) sont primordiales et les rôles respectifs que nous venons d'évoquer ne sont pas si cloisonnés.

Certaines protéines membranaires sont dites intrinsèques, ou transmembranaires, car elles sont introduites dans la membrane par un tronçon hydrophobe, dit « segment transmembranaire », qui les lie à la membrane par l'intermédiaire des forces hydrophobes. D'autres protéines, souvent solubles, sont dites extrinsèques, ou périphériques, car elles interagissent avec la membrane de façon beaucoup plus faible. Elles peuvent être liées de façon covalente à la membrane, à un lipide par exemple, ou bien seulement par une interaction polaire (électrostatique ou liaison hydrogène), à d'autres protéines membranaires par exemple.

Étant situées à l'interface entre le milieu interne et le milieu externe des cellules ou de leurs organelles, ces protéines peuvent être impliquées dans le transport passif (résultant d'une diffusion due à un gradient de concentration) ou actif (nécessitant l'apport d'énergie) de molécules à travers la membrane. De même, elles peuvent être impliquées dans la réception ou la transmission de signaux à travers la membrane. Enfin, elles jouent aussi un rôle dans la déformation ou le changement de topologie de cette dernière, comme dans le cas des processus d'endocytose ou d'exocytose, qui permettent l'échange de grosses particules avec le milieu externe.

Les sucres, ou glucides, sont en général liés aux protéines et aux lipides par des liens covalents : on parle alors de glycoprotéine ou de glycolipide (cf Figure 1.2).

Il faut noter qu'il y a très peu de sucres sur les membranes autres que la membrane plasmique, et qu'ils sont, le cas échéant, concentrés sur le côté extracellulaire [10]. Ceci

peut en partie être expliqué par le fait qu'ils interviennent surtout dans les processus de reconnaissance cellule-cellule [11] et dans la protection de la cellule (aussi bien chimique que mécanique) face au milieu extracellulaire [10].

Cette étude ayant été réalisée avec des systèmes purement lipidiques, nous nous focaliserons par la suite sur les lipides eux-mêmes. Nous nous pencherons plus particulièrement sur leur caractère amphiphile, et sur leurs façons de s'assembler en milieu aqueux et de former la structure des membranes.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux différents types de lipides structurant les membranes.

Enfin, nous introduirons la notion de transition de phase des lipides.

1 .1 Les lipides, des molécules amphiphiles

L'eau étant le solvant biologique, les composés sont habituellement caractérisés par leur affinité avec l'eau. Revenons donc, tout d'abord, sur ce qui définit un composé hydrophile et un composé hydrophobe.

Chaque molécule d'eau possède la capacité d'établir jusqu'à quatre liaisons hydrogènes avec d'autres molécules d'eau. Ce type de liaison implique un atome d'hydrogène d'une molécule et les électrons non liants d'un atome d'oxygène d'une autre molécule. Un réseau très mobile mais relativement serré est donc formé entre les molécules d'eau.

Les molécules dites hydrophobes - fuyant l'eau - ne peuvent pas établir de liaison hydrogène avec l'eau. En solution, elles ont donc tendance à perturber le réseau formé par les molécules d'eau interagissant entre elles par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. L'entropie du système diminue donc, et c'est pourquoi il est énergétiquement défavorable de mélanger ce type de molécule avec de l'eau [9]. Les molécules hydrophiles - aimant l'eau - peuvent, quant à elles engager des liaisons hydrogènes avec l'eau et perturbent donc moins ce réseau.

Néanmoins, les notions d'hydrophobicité et d'hydrophilicité sont continues, et très subtiles. Un composé peut être plus ou moins hydrophile, si les liaisons qu'il engage avec l'eau sont plus ou moins fortes. Le réseau de l'eau étant très dynamique, si le composé est capable d'engager des liaisons avec des molécules d'eau et de changer très souvent de partenaire, cela diminue moins l'entropie du système, et c'est donc plus favorable d'un point de vue énergétique. Quant aux composés hydrophobes, ils n'engagent pas de liaisons hydrogène avec l'eau mais interagissent tout de même avec cette dernière par l'intermédiaire de forces de van der Waals. Un composé hydrophobe peut donc être en contact avec l'eau et l'énergie surfacique que cela coûte donne une idée plus précise de son degré d'hydrophobicité.

Un lipide est une molécule amphiphile, ce qui signifie qu'il présente à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile (cf Figure 1.3). La partie hydrophile est généralement constituée d'un ion ou d'un groupement présentant un moment dipolaire. Cette polarité permet aux lipides de former des liaisons hydrogène avec l'eau. L'autre extrémité, formée à partir d'un squelette carboné, est hydrophobe et ne peut donc former de telles liaisons.

Du fait de ce caractère amphiphile, les lipides ont tendance à s'auto-assembler en milieu aqueux afin d'adopter une configuration d'énergie minimale leur permettant de protéger au maximum leurs parties hydrophobes du milieu aqueux environnant.

1 .1.1 Comportement des lipides en milieu aqueux

Les phospholipides sont les constituants majoritaires des membranes. Ces lipides possèdent deux « queues » hydrophobes. Dans des conditions physiologiques, leur réorganisation se fait généralement sous forme de bicouche (cf Figure 1.3). Cela permet aux phospholipides de protéger leurs parties hydrophobes en les regroupant au cœur de la bicouche et en présentant les parties hydrophiles à l'eau.

La structure des membranes repose sur cette configuration et son épaisseur est donc régie par la taille des lipides. C'est pourquoi l'épaisseur des membranes [2] est assez conservée d'une membrane à une autre, de l'ordre d'environ cinq nanomètres.

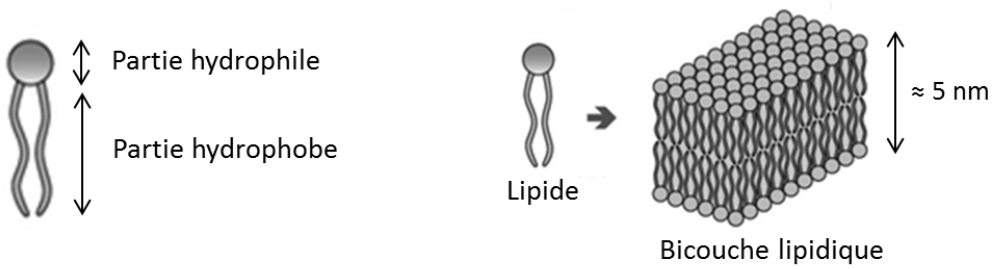


FIGURE 1.3 – **Représentations schématiques d'un lipide (gauche) et d'une bicouche lipidique (droite)**. Les lipides sont des molécules amphiphiles présentant deux parties distinctes : la partie hydrophile et la partie hydrophobe. En milieu aqueux, ils peuvent se réorganiser sous forme de bicouche afin de protéger leurs parties hydrophobes du contact avec l'eau. Ici, la partie hydrophobe est constituée de deux « queues » hydrophobes, comme c'est le cas pour une sous-catégorie de lipides : les phospholipides. *Figure adaptée à partir de avantipolarlipids.com.*

Les lipides peuvent s'organiser sous forme de bicouche, comme c'est le cas dans les conditions physiologiques, où ils forment la structure des membranes, mais ce n'est pas la seule configuration possible. La diversité des conformations que les lipides peuvent adopter dépend de différents paramètres tels que leur nature et leurs propriétés physico-chimiques, leur concentration, leur niveau d'hydratation, la température, *etc.*

À une concentration extrêmement faible, les lipides sous forme monomérique sont en général solubles dans l'eau, malgré le caractère énergétiquement défavorable du contact entre leur partie hydrophobe et l'eau. Au-delà d'une certaine concentration [3], ces molé-

2. L'épaisseur des bicouches n'est pas toujours définie de la même façon. Il s'agit parfois de la distance occupée par deux lipides en face à face, ou bien de la distance uniquement occupée par les parties hydrophobes de deux lipides se faisant face.

3. Cette concentration est l'équivalent de la concentration micellaire critique (CMC) pour les amphiphiles formant des micelles (lysolipides ou détergents, que nous présenterons plus tard), mais elle est, en général, bien plus faible que cette dernière.

cules ont tendance à s'auto-assembler et à former des agrégats dont la nature dépend des paramètres évoqués plus haut (nature du lipide, température ...).

Tout d'abord, la géométrie des molécules (tailles respectives des parties hydrophobe et hydrophile) est primordiale [12].

Le facteur P [4] permet de comparer ces tailles de façon simple. $P = \frac{V}{a\,l}$ avec V le volume occupé par la partie hydrophobe, a l'aire occupée par un lipide au niveau de la limite entre parties hydrophile et hydrophobe et l la longueur effective de la partie hydrophobe (cf Figure 1.4).

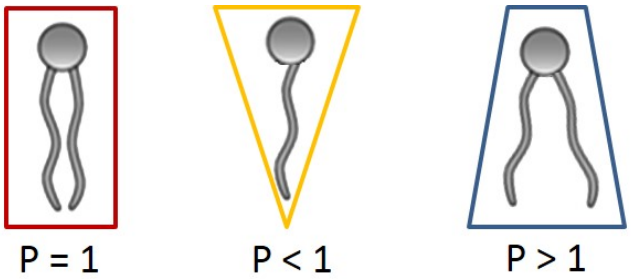


FIGURE 1.4 – **Différentes géométries de lipides**. Le rapport de volumes occupés par leur tête polaire et leur partie hydrophobe donne une idée de la géométrie adoptée par les lipides.

Si la molécule est cylindrique, c'est-à-dire si la section de la tête hydrophile est de taille comparable à celle de la partie hydrophobe, ou si $P = 1$, des bicouches planes vont être formées (cf Figure 1.5, schéma rouge). En effet, la surface occupée par les têtes polaires est comparable à celle occupée par les parties hydrophobes, et l'ensemble de ces dernières pourront facilement être protégées de l'eau par les têtes polaires. C'est le cas de la majorité des phospholipides constituant les membranes biologiques, qui possèdent deux queues hydrophobes et une partie hydrophile de taille relativement grande.

En revanche, s'il existe une asymétrie de taille entre les deux composantes de la molécule, une courbure spontanée va être introduite afin de protéger au mieux les parties hydrophobes. C'est le cas des lysolipides, qui ont perdu une de leurs chaînes carbonées. Ces molécules présentent donc une forme conique ($P < 1$). Des structures en monocouches, appelées micelles, seront donc formées (cf Figure 1.5, schéma jaune). Ce sont des agencements de forme sphérique, où les têtes hydrophiles sont dirigées vers l'extérieur de la sphère et où les queues hydrophobes pointent toutes vers l'intérieur.

À l'inverse, dans le cas où la tête polaire est de petite taille ($P > 1$), une micelle inverse devrait être formée (cf Figure 1.5, schéma bleu). Le seul moyen que ce type de structure apparaisse en milieu aqueux est que les lipides soient à une concentration suffisante pour que ces micelles puissent se réarranger sous la forme d'un réseau hexagonal (cf Figure 1.6).

Il existe d'autres phases plus complexes (phase éponge, phase hexagonale ou rhombohédrale, *etc.*) mais cela va au-delà du but de notre étude.

4. La nomenclature P provient de l'anglais *Packing parameter*, soit « paramètre de tassement ».

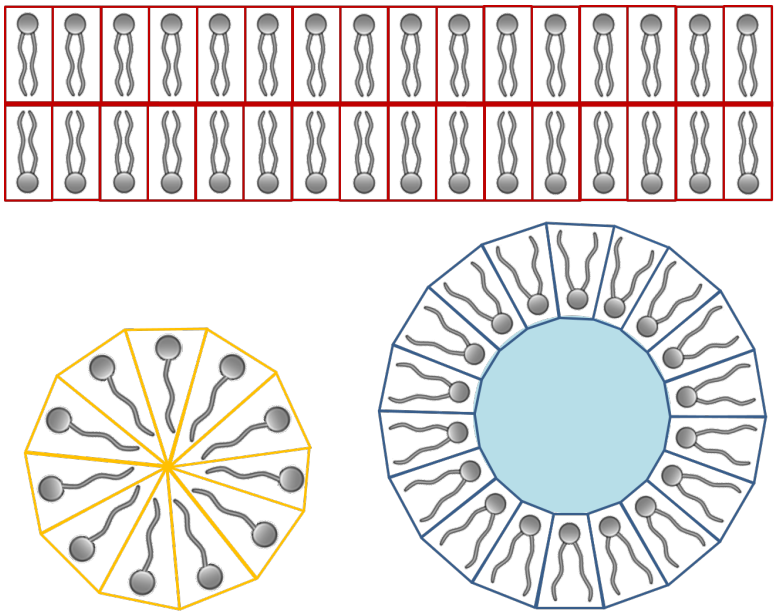


FIGURE 1.5 – **Représentations schématiques d'une bicouche plane, d'une micelle et d'une micelle inverse**. Afin de protéger au maximum leurs parties hydrophobes du milieu aqueux environnant, les lipides peuvent adopter différentes configurations en fonction de leur géométrie. Les bicouches planes et les micelles en sont des exemples. Les micelles inverses ne permettent cette protection que lorsqu'elles s'agencent entre elles et forment un réseau de micelles inverses, l'eau étant alors uniquement présente en leur sein.

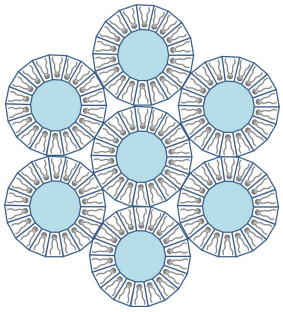


FIGURE 1.6 – **Organisation de micelles inverses sous forme de réseau hexagonal**.

La taille de la tête polaire a donc une influence majeure sur la géométrie du lipide. Le degré d'insaturation de la queue hydrophobe est aussi un facteur important. Lorsqu'une double liaison est ajoutée à une queue hydrophobe, un coude, ou « kink » en anglais, est formé dans celle-ci, ce qui la raccourcit et augmente la section occupée par la queue hydrophobe. Le facteur P augmente donc.

La température a également une influence sur la façon dont les lipides s'agencent en milieu aqueux (cf Figure 1.7). En augmentant la température de l'échantillon, les fluctuations thermiques sont plus abondantes et les lipides explorent un paysage énergétique plus vaste. De plus nombreuses conformations leur sont donc potentiellement accessibles.

Les fluctuations thermiques ont aussi un autre effet sur l'agencement des lipides puisqu'elles modifient la géométrie effective des lipides. En effet, en augmentant la température,

les chaînes carbonées sont plus mobiles et le volume apparent des chaînes est accru. La molécule paraît donc plus conique.

Enfin, le niveau d'hydratation a aussi son importance (cf Figure 1.7). À titre d'exemple, des micelles cylindriques peuvent être formées à partir de micelles sphériques, et s'arranger sous forme de réseau hexagonal lorsque la quantité d'eau est vraiment faible (cf Figure 1.8). De plus, de la même façon que pour la température, changer le niveau d'hydratation modifie la géométrie effective des lipides. Le nombre de molécules d'eau fortement liées à la tête polaire des lipides variant, la forme apparente du lipide est également modifiée. Cette fois, c'est la tête polaire qui devient plus volumineuse, et P qui diminue.

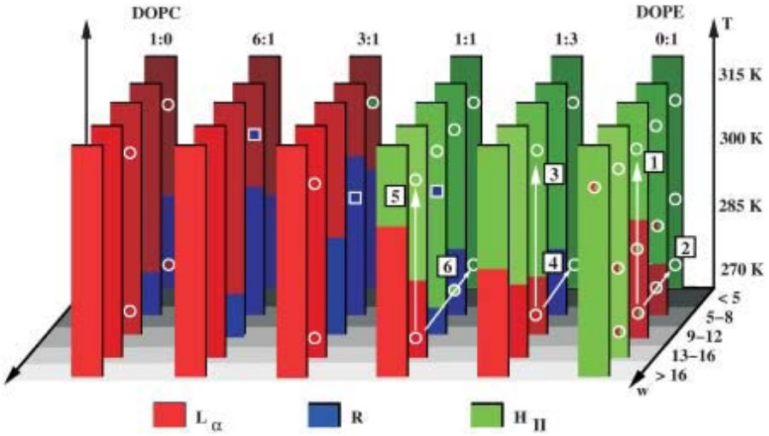


FIGURE 1.7 – **Diagramme de phase du mélange DOPC/DOPE**. Différentes phases (lamellaire L_α, rhombohédrale R et hexagonale inverse H_{II}) peuvent être observées pour le mélange DOPC/DOPE en fonction de leurs proportions relatives, de la température T et de l'hydratation w, exprimée en nombre de molécules d'eau par lipide. Le DOPC est cylindrique et forme donc des bicouches tandis que le DOPE présente une géométrie conique et ne forme pas de structure lamellaire lorsqu'il est seul. *Figure extraite de [13].*

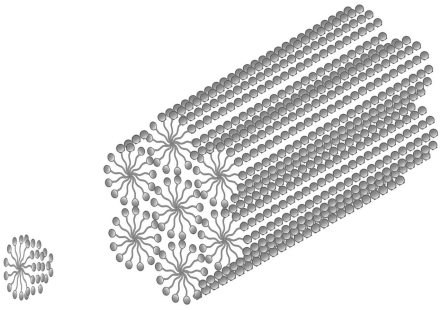


FIGURE 1.8 – **Représentations schématiques en coupe d'une micelle sphérique et d'un réseau hexagonal de micelles cylindriques**. Lorsque la quantité d'eau diminue, les structures micellaires sphériques peuvent disparaître au profit de structures micellaires cylindriques qui peuvent d'agencer sous la forme d'un réseau hexagonal.

1 .1.2 Formation de compartiments lipidiques

Du fait de la géométrie pratiquement cylindrique de la majorité des lipides constituant les membranes, des températures et des conditions d'hydratation physiologiques, les lipides membranaires s'agencent spontanément en phase lamellaire. C'est la configuration qui permet de former les bicouches lipidiques qui constituent la matrice des membranes biologiques.

Même dans le cas où la courbure intrinsèque de la membrane est nulle, les bicouches ont tendance à se refermer sur elles-mêmes - donc à se courber - pour éliminer les bords où les queues hydrophobes des lipides pourraient toujours être en contact avec l'eau. En scellant les bords, un compartiment est alors formé (cf Figure 1.9).

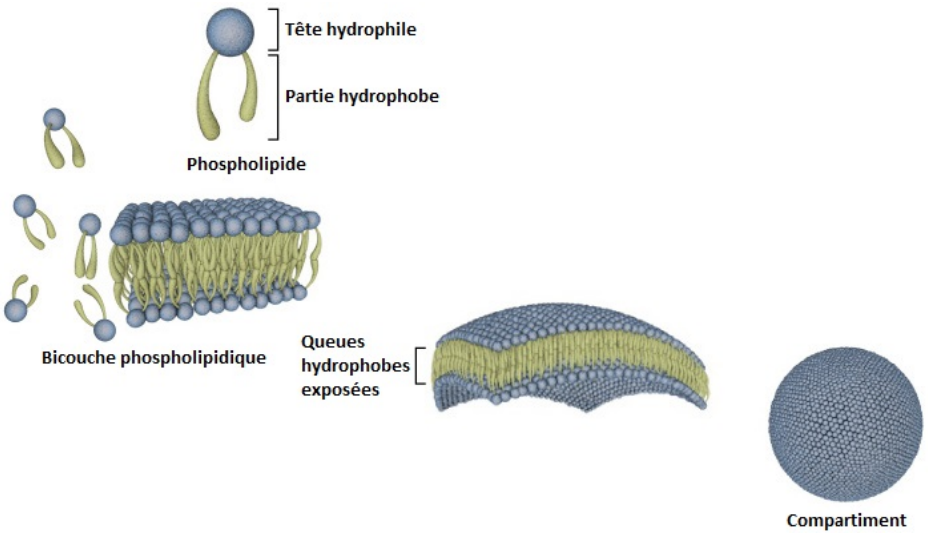


FIGURE 1.9 – **Formation d'un compartiment fermé à partir d'un ensemble de lipides en solution**. En milieu aqueux, les molécules amphiphiles que sont les phospholipides s'assemblent pour former des bicouches lipidiques, qui ont alors tendance à se refermer sur elles-mêmes afin de protéger les bords, toujours accessibles à l'eau. Ces structures fermées sont nommées « vésicules ».

La courbure engendrée est, en général, très faible à l'échelle des lipides. C'est pour cela que courber la membrane [5] a un coût énergétique plus faible que celui correspondant à une situation où certaines queues hydrophobes resteraient au contact de l'eau, rendant ainsi possible la formation de structures fermées.

De telles bicouches lipidiques sphériques sont nommées « vésicules ». Nous reviendrons dessus en 2 .2. Il s'agit de modèles intéressants pour étudier les membranes biologiques, car ils miment la membrane plasmique ou la membrane délimitant les organelles les plus simples de la cellule.

5. Il est important de préciser que comme l'énergie de courbure par lipide varie comme $\frac{1}{R^2}$ et que le nombre de lipides présents sur une sphère varie comme R^2, l'énergie de courbure totale d'une sphère est indépendante de son rayon.

1 .2 Classification des lipides structurels

La diversité des lipides est très importante [9]. Ils sont tous amphiphiles mais possèdent chacun une structure propre.

Les lipides structurels sont ceux qui forment la structure des membranes biologiques, à la différence d'autres lipides présents chez les organismes vivants qui n'interviennent pas dans la formation de ces dernières mais ont néanmoins une fonction primordiale. C'est par exemple le cas des triglycérides, ou triacylglycérols, qui sont stockés dans des cellules spécialisées et sont à la base de la production d'énergie [9].

Notre étude portant sur les membranes, nous nous intéresserons par la suite uniquement aux lipides structurels, et en particulier aux deux principales catégories de ces lipides : les phospholipides et les stérols.

1 .2.1 Les phospholipides

La classe dominante des lipides présents dans les membranes biologiques est celle des phospholipides. Selon les membranes, elle représente entre 50% et 100% des lipides la structurant [14]. Leur partie hydrophile peut être représentée par une « tête » polaire tandis que la partie hydrophobe peut l'être par deux « queues » hydrophobes, chacune principalement constituée d'une chaîne carbonée (cf Figures 1.3 et 1.10). Ils comportent tous un groupement phosphate, d'où leur dénomination.

Les phospholipides peuvent être classés en deux sous-catégories : les glycérophospholipides, les plus communs, qui sont bâtis à partir d'un squelette glycérol (cf Figure 1.10), et les sphingophospholipides, à partir d'une sphingosine (cf Figure 1.12).

Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont bâtis à partir d'un glycérol, molécule comportant trois fonctions alcool (cf Figure 1.10). Ils peuvent, eux-mêmes, être répartis en deux nouvelles catégories.

Les ester-glycérophospholipides sont les plus communs. Ils sont le résultat de l'estérification de deux des alcools du glycérol par un acide gras (cf Figure 1.10 haut).

Les éther-glycérophospholipides sont, quant à eux, obtenus lorsqu'au moins un des deux alcools du glycérol créé une liaison éther avec un alcool gras plutôt que la liaison ester habituelle (cf Figure 1.10 bas). Les plasmalogènes sont un cas particulier des éther-glycérophospholipides, obtenus quand le lipide ne possède qu'une seule liaison éther et lorsque l'alcool gras correspondant possède une insaturation en dernière position avant le groupement alcool.

Les acides gras sont obtenus en ajoutant un groupement -COOH à l'extrémité d'une chaîne carbonée, tandis qu'un groupement -OH y est greffé pour les alcools gras. Dans les deux cas, ces chaînes carbonées contiennent en général entre 14 et 22 carbones [9].

Tout comme l'ADN est formé à partir de nucléotides ou les protéines à partir d'acides

aminés, et comme le corps est capable d'assembler ces blocs élémentaires pour former de plus grandes structures, le corps peut utiliser des acides gras pour former différents lipides. Il est, en revanche, incapable de synthétiser les acides gras eux-mêmes. Ces derniers proviennent donc essentiellement de notre alimentation.

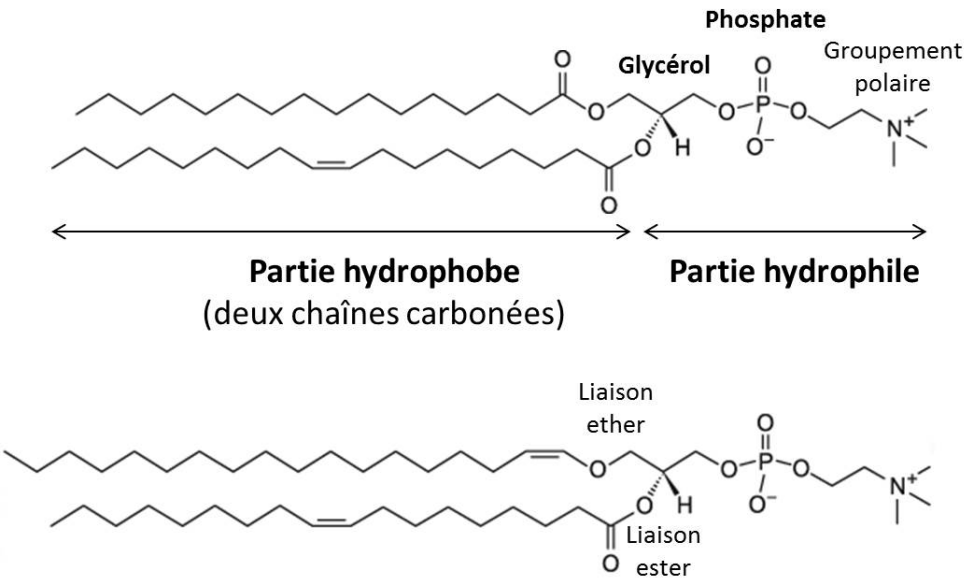


FIGURE 1.10 – **Représentations du POPC et du 18(Plasm)-18:1 PC**. *Haut :* Le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) est un ester-glycérophospholipide très présent dans les membranes biologiques. Sa tête polaire est constituée d'un groupement choline relié au groupement phosphate habituel. Sa partie hydrophobe est constituée de deux chaînes carbonées dérivées des acides palmitique (16 carbones) et oléique (18 carbones, et une insaturation). Les autres ester-glycérophospholipides sont structurés de la même façon mais la longueur des chaînes carbonées ainsi que le nombre d'insaturations peuvent changer. De même le groupement polaire de la tête est variable. *Bas :* Le 18(Plasm)-18:1 PC (1-(1Z-octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) est l'éther-glycérophospholipide analogue du POPC. Il comporte la même tête polaire, la même chaîne issue de l'acide oléique, mais son autre queue hydrophobe provient d'un alcool gras, et non d'un acide gras, possédant 18 carbones. Elle est donc liée au glycérol par une liaison éther.

Pour expliciter le mécanisme de formation d'un glycérophospholipide (cf Figure 1.11), l'exemple des ester-glycérophospholipides est pris. Une fois les deux acides gras (cf Figure 1.11a) greffés au glycérol, on obtient alors un diacylglycérol (cf Figure 1.11b), dont le dernier groupement alcool peut être lié à un acide phosphorique pour former un acide phosphatidique (cf Figure 1.11c). Enfin, le groupement phosphate peut réagir avec un alcool qui constituera le groupement polaire du glycérophospholipide résultant (cf Figure 1.11d).

Les phospholipides peuvent donc être classés en fonction de la nature de leur tête polaire et de sa charge. La tête peut être ionique - anionique (chargée négativement) ou cationique (chargée positivement) - ou bien zwitterionique, si elle présente deux charges opposées. Il

existe différents groupements polaires, dont les principaux sont le groupement choline, le groupement ethanolamine, le groupement sérine et le groupement inositol.

Les phospholipides peuvent aussi être classés en fonction de la nature de leurs queues hydrophobes, provenant d'acides ou d'alcools gras, ou de la longueur de ces dernières (correspondant au nombre d'atomes de carbone). Le nombre d'insaturations de ces chaînes carbonées est également important. Il correspond au nombre de doubles liaisons liant entre eux deux atomes de carbone consécutifs. S'il n'existe aucune double liaison, le lipide est dit saturé. À l'inverse, s'il existe au moins une double liaison, on parle de lipide insaturé et s'il en existe plusieurs, le terme « polyinsaturé » est utilisé. Enfin, la position de la ou des insaturations définit également un lipide.

Les acides gras les plus communs ont des noms d'usage mais une nomenclature systématique existe. On précise la nature de la tête polaire et le nombre d'atomes de carbone et d'insaturations de chaque chaîne. À titre d'exemple, le POPC est formé à partir de l'acide Palimitique (16 carbones), de l'acide Oléique (18 carbones et une insaturation) et du groupement Choline. On s'y réfère en notant 16:0–18:1 PC.

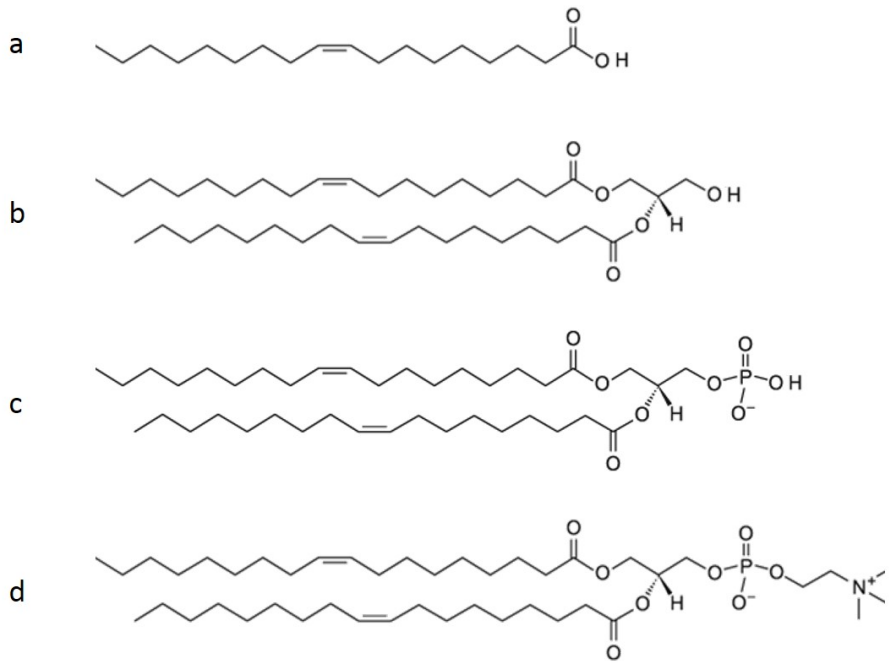


FIGURE 1.11 – **Formation d'un glycérophospholipide**. *a :* Acide gras (acide oléique). *b :* Diacylglycérol. *c :* Acide phosphatidique. *d :* Glycérophospholipide (DOPC).

Les sphingophospholipides

Les sphingophospholipides forment une autre classe de lipides structurels. Leur fraction est nettement moins importante que celle des glycérophospholipides. Selon les membranes, ils représentent entre 0 et 10% des lipides totaux [14].

Ces lipides se différencient des glycérophospholipides par le fait qu'ils ne sont pas formés à partir d'un glycérol mais à partir d'une sphingosine (cf Figure 1.12). Cet alcool gras,

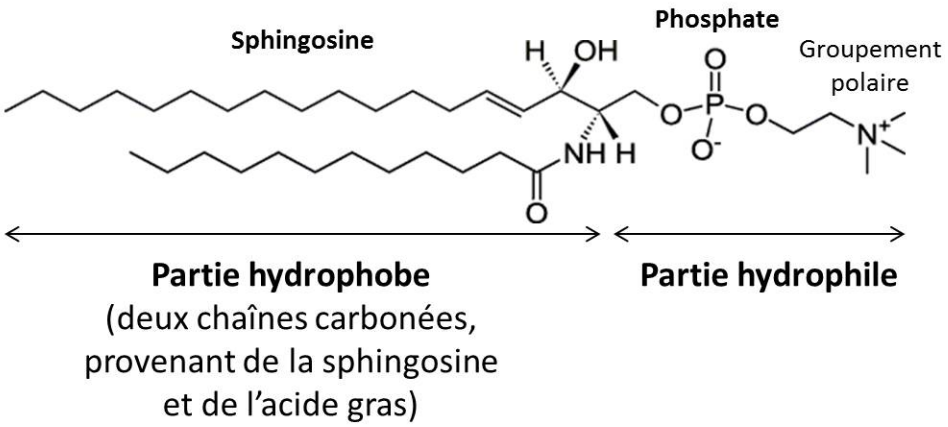


FIGURE 1.12 – **Représentation de la SM 12:0**. La SM 12:0 (N-(dodecanoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine) est une sphingomyéline, de la famille de sphigophospholipides, particulière. Sa tête polaire est constituée d'un groupement choline relié à un groupement phosphate tandis que sa partie hydrophobe est constituée d'une sphingosine à laquelle est greffée une chaîne carbonée dérivée de l'acide dodécanoïque (12 carbones). À la différence des glycérophospholipides, il n'y a pas de glycérol mais c'est la sphingosine elle-même qui se lie au groupement phosphate.

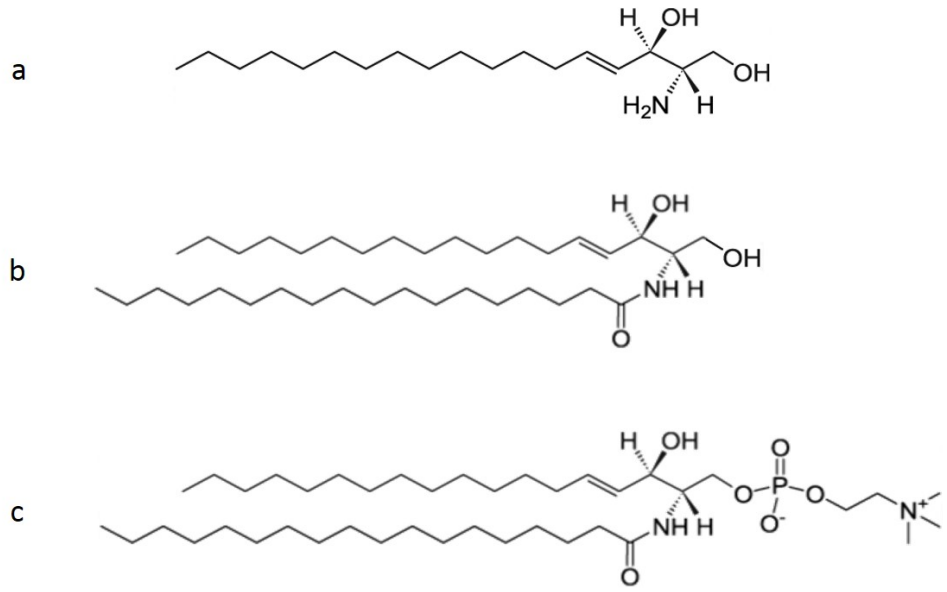


FIGURE 1.13 – **Formation d'une sphingomyéline**. *a :* Sphingosine. *b :* Céramide. *c :* Sphingomyéline (SM 18:0).

comportant 18 carbones, constitue une des queues hydrophobes du lipide ainsi que le site de fixation pour un acide gras, qui peut y être lié par l'intermédiaire d'une liaison amide pour former la seconde queue hydrophobe du lipide. On obtient alors un céramide (cf Figure 1.13b). On parle de sphingomyéline[6] quand un groupement polaire, souvent choline, est lié au groupement phosphate fixé au céramide (cf Figures 1.12 et 1.13c).

6. La sphingomyéline est très présente dans les gaines de myéline qui isolent les fibres nerveuses.

1 .2.2 Les stérols

La fraction typique des stérols varie d'une membrane à une autre. Ils atteignent 50% de la fraction totale des lipides dans la membrane plasmique mais ne représentent que 10% des lipides membranaires dans les mitochondries [14].

À la différence des phospholipides, la partie hydrophobe des stérols n'est pas constituée de deux chaînes carbonées hydrophobes mais d'un squelette carboné très rigide, formé par un noyau stérane (constitué de quatre cycles), auquel peut être liée une courte chaîne carbonée variable (cf Figure 1.14).

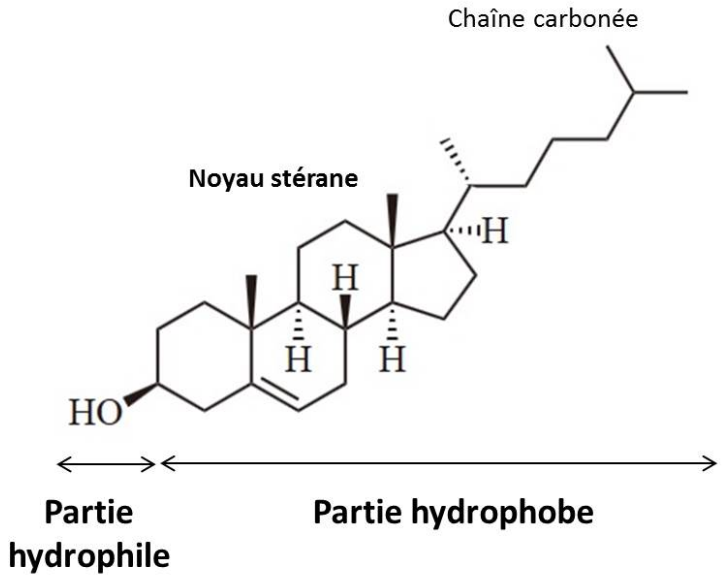


FIGURE 1.14 – **Représentation du cholestérol**. Sa tête polaire est constituée d'un groupe hydroxyle, comme tous les stérols. Sa partie hydrophobe est constituée d'un noyau stérane lié à une courte chaîne carbonée, qui peut varier d'un stérol à un autre.

De plus, les stérols n'ont pas une tête polaire variable. Elle est uniquement constituée d'un groupe hydroxyle – OH (cf Figure 1.14). Ces lipides sont donc plus hydrophobes que les phospholipides (du fait de la petite taille de leur tête polaire) et s'intercalent donc entre eux, à l'intérieur de la membrane (cf Figure 1.2).

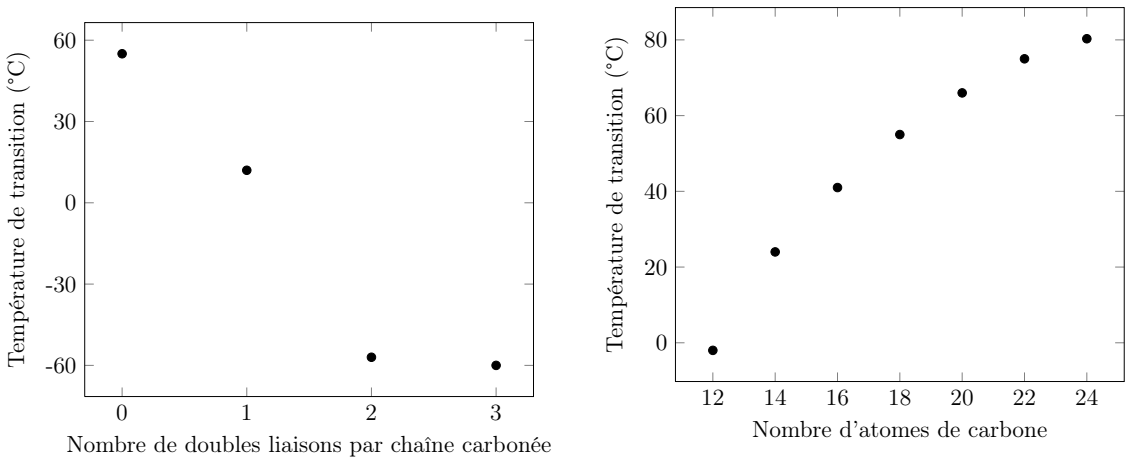
Le stérol majoritairement trouvé chez les mammifères est le cholestérol (cf Figure 1.14). Il est considéré comme un régulateur de la fluidité des membranes car il les fluidifie à basse température en s'intercalant entre les phospholipides et les empêchant d'atteindre un entassement maximal, et les rigidifie à haute température grâce à la rigidité intrinsèque de son noyau stérane.

1 .3 Transition de phase des lipides

Les lipides peuvent être sous plusieurs phases. Chaque lipide possède une température de transition de phase, qui lui est propre et dépend de ses caractéristiques physiques.

En dessous de cette température, les chaînes carbonées sont ordonnées, parallèles entre elles et peu mobiles. Cela correspond à une phase solide, ou « phase gel ». Au-delà de cette température, les rotations autour d'une liaison sont facilitées et les chaînes carbonées des lipides sont plus fluides. Elles sont donc orientées de manière quasi-aléatoire et animées de mouvements plus ou moins pendulaires. On parle alors de « phase liquide désordonnée ».

Le degré d'insaturation et la longueur des chaînes carbonées sont les deux principaux paramètres qui influencent la température de transition du lipide (cf Figure 1.15).



(a) Température de transition d'un lipide possédant deux chaînes de 18 carbones identiques en fonction de leur nombre d'insaturations.

(b) Température de transition d'un lipide saturé en fonction du nombre de carbones des chaînes, les deux chaînes carbonées étant identiques.

FIGURE 1.15 – **Température de transition des lipides**.

Même à haute température, les atomes ne peuvent pas pivoter autour de l'axe d'une double liaison. Ces doubles liaisons sont donc toujours dans la même configuration - *cis* ou *trans*. Généralement, la configuration *trans* est adoptée [7], ce qui introduit un coude dans la chaîne aliphatique, comme nous l'avons évoqué plus haut. L'ajout d'une double liaison diminue donc la compaction maximale pouvant être atteinte. Étant moins resserrés, les lipides entrent de ce fait en phase fluide à une température plus basse. La température de transition diminue donc avec le degré d'insaturation (cf Figure 1.15a).

La longueur des queues hydrophobes a aussi une influence sur la température de transition des lipides. Lorsque celle-ci est accrue, la température de transition l'est aussi. En effet, les forces de van der Waals existant entre les lipides augmentent avec la longueur des chaînes carbonées, et ces derniers s'attirent donc plus les uns les autres. Par conséquent, il faut plus chauffer pour former une phase fluide. La température de transition augmente donc avec la longueur des chaînes (cf Figure 1.15b).

Pour des mélanges de lipides dont les températures de transition sont différentes, les

7. Il existe néanmoins des lipides présentant une double liaison bloquée en conformation *cis*.

transitions de phase ne sont pas aisément prévisibles. Dans des gammes de température particulières, et pour certaines concentrations de lipides de chaque type, des domaines peuvent éventuellement apparaître, regroupant certains lipides entre eux.

2 Membranes lipidiques artificielles

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette partie, les membranes biologiques sont des systèmes très complexes. Dans notre étude, nous avons donc choisi de travailler avec des systèmes modèles : les vésicules lipidiques. Ce sont des compartiments lipidiques formés par une bicouche plane refermée sur elle-même, que nous avons introduits dans la section 1 .1.2.

Si les systèmes purement lipidiques sont incapables de mimer la complexité des membranes biologiques réelles, ils sont nécessaires, comme tout modèle, pour faciliter notre compréhension de processus biologiques difficiles à appréhender dans leur globalité à cause de la multitude de paramètres intriqués les uns aux autres. De plus, la plupart des paramètres pouvant être ajoutés séparément, cela permet de se focaliser sur chacun d'entre eux et d'étudier leurs rôles indépendamment de ceux des autres. Enfin, un autre avantage des systèmes modèles assemblés *in vitro* est d'avoir une composition lipidique définie [8].

Malgré ces avantages indéniables, il est essentiel de garder en tête que ce sont de systèmes modèles, assemblés *in vitro*, et ne permettant pas de reconstituer l'intégralité des propriétés des membranes réelles.

Le choix du système est crucial. Il faut qu'il corresponde à un bon équilibre : trop de détails spécifiques rendront le modèle applicable à un champ trop restreint, et pourront même nuire à la clarté des résultats, mais un système trop grossier ne nous apprendra rien.

Dans notre cas, nous souhaitons étudier la fusion des membranes, et en particulier certains aspects énergétiques. Même si les membranes biologiques ne sont pas purement lipidiques, le résultat de la réorganisation globale topologique qu'est la fusion membranaire reste la coalescence des deux feuillets lipidiques. L'étude de la fusion de bicouches purement lipidiques permet donc d'en apprendre beaucoup sur le processus de la fusion membranaire en soi, et il est même difficile d'imaginer comprendre complètement le processus de fusion membranaire sans que le processus de fusion de bicouches lipidiques ne soit totalement élucidé.

Dans cette partie, nous présenterons donc, dans un premier temps, les différents modèles de bicouches lipidiques.

8. Il est toutefois important de noter que l'on sait quels lipides sont utilisés pour préparer les échantillons mais qu'il n'est pas certain qu'ils soient tous incorporés dans les structures naissantes. De plus, rien ne dit que toutes les structures possèdent exactement la même composition lipidique. Enfin, les bicouches lipidiques peuvent être asymétriques et, même si la composition lipidique totale était connue, la composition peut différer d'un feuillet à l'autre, ce qui est très difficile à vérifier. Dans la majorité des études, y compris celle-ci, on considère quand même que la composition des membranes préparées est proche de celle des lipides utilisés pour leur formation.

Ensuite, nous pourrons nous focaliser sur les vésicules lipidiques, les systèmes modèles que nous avons utilisés dans cette étude.

2 .1 Modèles de bicouches lipidiques

Différents systèmes modèles de bicouches lipidiques ont été mis au point par la communauté scientifique (cf Figure 1.16). Ils peuvent être en deux dimensions lorsque la bicouche est plane, ou en trois dimensions, lorsque cette dernière est refermée sur elle-même et encapsule un volume aqueux, comme c'est le cas des vésicules lipidiques.

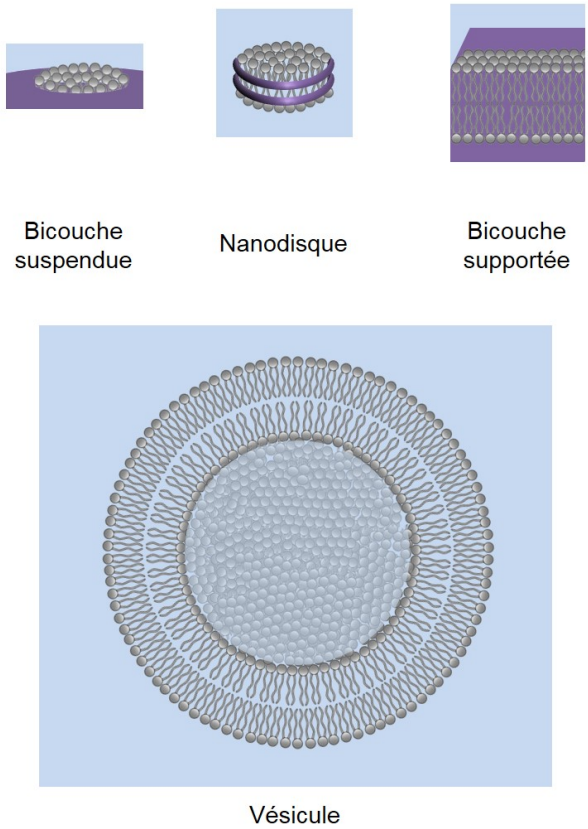


FIGURE 1.16 – **Différents systèmes modèles de bicouches lipidiques**. Les bicouches peuvent être planes (suspendues ou supportées) ou sphériques.

Les premières bicouches lipidiques plates qui ont été développées étaient des bicouches suspendues [15], parfois dites « bicouches peintes », en référence à la façon dont elles sont fabriquées. Des lipides dissouts dans un solvant organique sont déposés sur une ouverture micrométrique dans un matériau tel que le téflon et forment une membrane comme « tendue » entre les rebords de ce pore (cf Figure 1.16). Ces bicouches sont donc presque totalement immergées dans le milieu aqueux. L'inconvénient majeur de ce type de membranes est leur faible stabilité et la présence de solvant résiduel.

Depuis, d'autres formes de bicouches suspendues ont été conçues. Les « nanodisques » [16] sont des petites bicouches lipidiques planes solubilisées en milieu aqueux par une protéine

toroïdale qui les encercle, leur sert d'échafaudage et protège les queues hydrophobes périphériques du contact avec l'eau (cf Figure 1.16).

D'autres formes de bicouches lipidiques planes existent. Elles sont dites « supportées » car elles sont adsorbées sur la surface d'un substrat. Les têtes polaires d'un des feuillets sont, en réalité, séparées du substrat hydrophile (du verre, par exemple) par une très fine couche d'eau. Les têtes de l'autre monocouche sont immergées dans le milieu aqueux (cf Figure 1.16).

Les premières bicouches supportées à avoir été conçues ont été réalisées par dépositions successives de deux monocouches lipidiques sur le substrat [17]. Ces systèmes sont très stables en comparaison des bicouches suspendues. Cependant, elles présentent, elles aussi, un inconvénient majeur. Si la fine couche d'eau séparant une des monocouches lipidiques de la surface solide permet la diffusion de lipides, elle n'est souvent pas assez épaisse pour permettre à d'éventuelles protéines incorporées dans la membrane de diffuser et peut même les amener à se déformer ou à être dénaturées. Sans aller jusque-là, les protéines peuvent aussi tout simplement interagir avec le substrat, ce qui peut modifier certaines de leurs propriétés. Enfin, la présence du substrat à proximité de la membrane peut limiter ses fluctuations et donc modifier son comportement.

Des variantes de ces bicouches supportées ont donc vu le jour. De telles bicouches lipidiques sont déposées sur un substrat solide où une couche de polymères a auparavant été déposée (cf [18] pour une revue). Les frottements entre la bicouche de lipides et le substrat sont donc très limités.

Les vésicules constituent un autre modèle de bicouche lipidique. C'est avec ce modèle que nous avons travaillé dans cette étude, et que nous allons donc présenter plus en détails.

2 .2 Classification des liposomes

Les vésicules, ou liposomes, sont des structures lipidiques sphériques agencées à partir de bicouches. Ces deux termes seront utilisés indifféremment dans le manuscrit.

C'est ce système modèle qui mime le degré zéro de l'organisation cellulaire : la membrane d'une cellule ou d'une organelle. La facilité de préparation de ce système explique sa fréquente utilisation pour l'étude des membranes.

Du fait du caractère amphiphile des lipides, les liposomes se forment en général spontanément lorsqu'un film lipidique est hydraté. Cependant, un certain nombre de conditions restent nécessaires pour que la formation de telles structures soit possible.

D'une part, pour que les lipides forment des agrégats, il faut que leur concentration soit supérieure à une certaine concentration, qui varie d'un lipide à l'autre, mais reste en général très faible. En dessous, les lipides resteront sous forme de monomères dans la solution aqueuse. Il est tout de même nécessaire que la proportion d'eau soit suffisante pour permettre un tel agencement (il existe un volume d'eau encapsulé dans les vésicules).

De plus, la température doit être supérieure à la température de transition de phase des lipides. La « phase gel », limitant la mobilité des chaînes de lipides, ne facilite pas la réorganisation des lipides et la formation de liposomes.

Enfin, la géométrie des lipides doit leur permettre de former des structures en bicouches (c'est-à-dire que la taille de leur tête polaire doit être comparable à celle de leur partie hydrophobe, ou légèrement supérieure).

Si toutes ces conditions sont réunies, la formation de structures lamellaires est possible. Il faut noter que si la composition lipidique n'est pas pure, la température de transition résultante dépendra des différentes températures de transition des lipides. De même, il est possible d'incorporer une quantité limitée de lipides présentant des géométries très coniques ou coniques inverses dans des vésicules, même si ces lipides n'auraient pas pu, à eux seuls, former des vésicules. Cela tend à déstabiliser la membrane, mais pas forcément au point de mettre en péril son intégrité.

Les liposomes sont classés en fonction de leur taille et de leur lamellarité (cf Figure 1.17). Ils peuvent être unilamellaires (c'est-à-dire ne présenter qu'une seule bicouche) ou non. Lorsqu'ils ne le sont pas, on a l'habitude de distinguer les liposomes où plusieurs vésicules sont situées à l'intérieur d'une autre vésicule et les vésicules multilamellaires, présentant de multiples bicouches concentriques, s'apparentant plutôt à des oignons ou à des poupées russes.

Les vésicules unilamellaires peuvent être réparties en trois catégories, qui ont été définies de façon assez arbitraire. Par habitude, on distingue :

les SUV : (pour « small unilamelar vesicles » en anglais, soit « petites vésicules unilamellaires ») qui ont une taille variant de 20 à 100 nm.

les LUV : (pour « large unilamelar vesicles » en anglais, soit « grandes vésicules unilamellaires ») pour une taille allant de 100 nm à 3 μm.

les GUV : (pour « giant unilamelar vesicles » en anglais, soit « vésicules unilamellaires géantes ») quand leur taille est supérieure à 3 μm.

On parle de MLV (pour « multilamellar vesicles » en anglais) quand les vésicules sont multilamellaires.

Nous avons surtout travaillé avec des LUV dans notre étude. Les techniques de formation des LUV sont regroupées dans l'Annexe A.

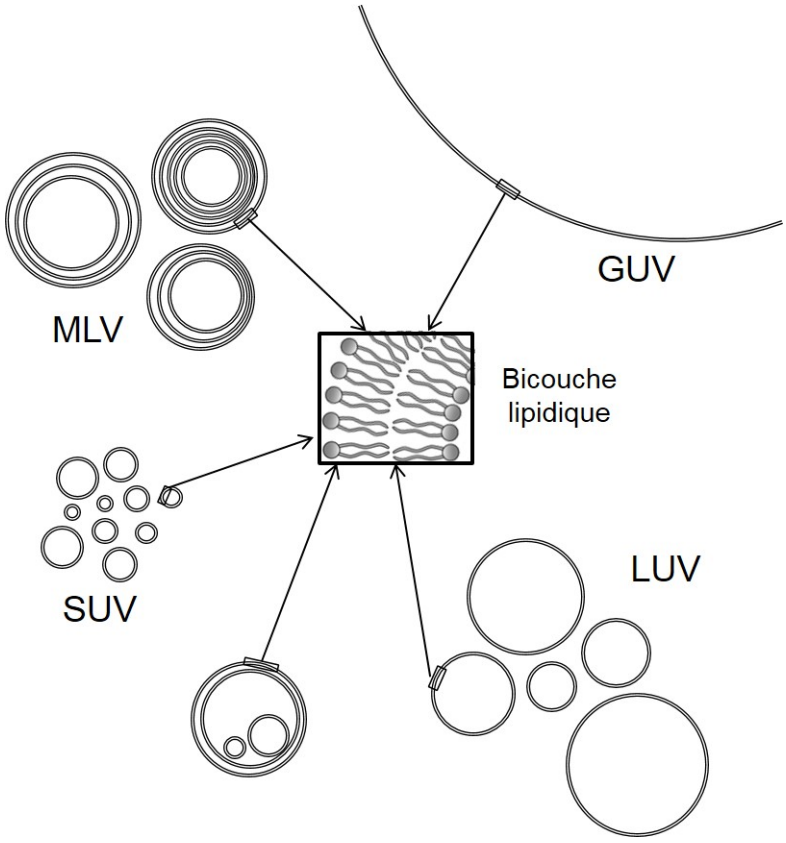


FIGURE 1.17 – **Différents types de liposomes**. Les liposomes peuvent être répartis en plusieurs groupes : les vésicules multilamellaires (MLV) et les vésicules unilamellaires. Les structures unilamellaires peuvent être classées en trois sous-catégories : les GUV, les LUV et les SUV, par ordre décroissant de taille.

Chapitre 2

Fusion membranaire et aspects énergétiques

La fusion membranaire est un processus qui permet de passer de deux membranes distinctes à une seule structure continue, grâce à un réarrangement considérable des constituants des membranes mises en jeu (cf Figure 2.1). Les compartiments initiaux se retrouvent alors interconnectés par un pont aqueux, dit « pore de fusion », permettant aux contenus de se mélanger ou de réagir. Les constituants des membranes impliquées sont, eux aussi, mis en commun.

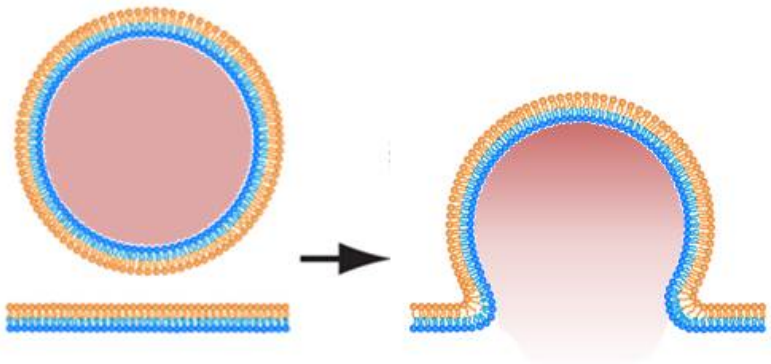


FIGURE 2.1 – **Fusion membranaire**. La fusion membranaire entraîne un partage des constituants des membranes et un mélange des contenus initialement encapsulés par les membranes. *Figure adaptée de http ://chaos.utexas.edu/people/faculty/ernst-ludwig-florin/membrane-fusion.*

Ce mécanisme, omniprésent dans le monde vivant, est à la base de la communication entre différents compartiments membranaires. Des phénomènes aussi divers que la fécondation, la neurotransmission, l'infection d'une cellule par un virus ou la sécrétion d'hormones reposent tous sur la fusion membranaire.

Bien évidemment, ces différents types de fusion varient de manière significative, en fonction de paramètres tels que la vitesse requise de fusion, la surface de contact entre les membranes, la distance les séparant, la nature des acteurs protéiques mis en jeu *etc.*

Néanmoins, ils partagent tous certaines caractéristiques, qui résultent de l'attraction

mutuelle des lipides pour protéger leurs queues hydrophobes. En effet, même si les membranes biologiques ne sont pas purement lipidiques, elles sont structurées par la bicouche lipidique elle-même. La fusion membranaire consistant avant tout en une réorganisation topologique, le comportement de la bicouche est, de ce fait, primordial. L'assemblage spontané des lipides, dicté par l'*effet hydrophobe* [19], confère à toutes les bicouches lipidiques un état d'énergie relativement bas, les contacts entre les chaînes hydrophobes des lipides et le milieu aqueux environnant étant minimisés. Pour que la fusion soit possible, cet arrangement doit être perturbé et certaines parties hydrophobes deviennent accessibles à l'eau, ce qui est moins favorable d'un point de vue énergétique. Les réarrangements moléculaires, nécessaires à la fusion membranaire, requièrent donc un apport d'énergie afin que les interfaces lipide-eau soient déstabilisées. De plus, si l'effet hydrophobe gouverne la façon dont les lipides sont initialement agencés, c'est également lui qui va régir la façon dont les bicouches se réarrangent pour fusionner, et les intermédiaires mis en jeu. C'est donc cet effet hydrophobe qui justifie les similitudes, dans les énergies et les modes de fusion, pouvant être observées entre les différents types de fusion.

Le mécanisme général de la fusion de deux vésicules est simple. Initialement séparées, les vésicules commencent par entrer en contact, ce qui engendre un partage des lipides des feuillets externes des membranes. La fusion s'achève par l'ouverture d'un pore de fusion, qui s'accompagne du mélange des contenus. Ces étapes correspondent à des phénomènes macroscopiques et sont donc relativement faciles à distinguer. Elles sont communes à tous les types de fusion.

En revanche, les aspects microscopique et énergétique de la fusion de bicouches lipidiques restent relativement incompris. Ceci s'explique par le fait que les réarrangements moléculaires survenant à chaque étape et les structures microscopiques des intermédiaires soient, quant à eux, très difficiles à étudier expérimentalement, du fait des échelles temporelle (de l'ordre de la nanoseconde) et spatiale (de l'ordre de quelques nanomètres) auxquelles ils ont lieu.

La fusion membranaire a donc, avant tout, été le sujet de nombreuses études théoriques [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27] et simulations numériques (cf [28] pour une revue). Ces deux approches permettent d'acquérir de nombreuses informations cruciales, qui sont inaccessibles expérimentalement.

In vivo, l'existence d'une barrière énergétique minimale à franchir pour que la fusion soit possible est essentielle pour que celle-ci n'ait pas lieu spontanément et de façon anarchique. Ce sont en général des protéines qui apportent l'énergie nécessaire. À titre d'exemple, dans le cas de l'exocytose régulée des neurotransmetteurs au niveau des synapses, ce sont les protéines SNARE qui sont les acteurs principaux de la fusion [29]. Ancrées sur deux membranes apposées, leur assemblage tire les membranes l'une contre l'autre et les force à fusionner (cf Figure 2.2).

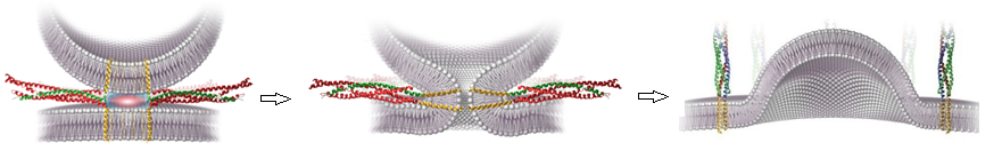


FIGURE 2.2 – **Fusion d'une vésicule synaptique avec la membrane présynaptique d'un neurone**. Les protéines SNAREs comportent toutes un motif SNARE qui permet la formation d'oligomères appelés « complexes SNAREs ». La formation d'un tel complexe entre la membrane présynaptique et la vésicule synaptique rapproche les membranes l'une de l'autre et les fait fusionner. Les neurotransmetteurs, encapsulés dans la vésicule synaptique, sont libérés à l'extérieur du neurone, dans la fente synaptique, grâce à l'ouverture d'un pore de fusion.

De nombreuses études théoriques et simulations numériques ont été réalisées et prédisent que l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques serait comprise entre 20 et 150 k_BT [22, 23, 24, 30, 31, 32], avec $k_BT \simeq 4\ 10^{-21} J$ l'énergie thermique à température ambiante (k_B, la constante de Boltzmann et $T = 298K$, la température absolue).

À notre connaissance, aucune mesure expérimentale de l'énergie de fusion sans forcer les membranes l'une contre l'autre n'a encore été réalisée à ce jour. C'est donc sur ce point que porte notre étude, le but étant de mettre au point un protocole permettant de mesurer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de bicouches lipidiques.

Dans ce chapitre, nous décrirons brièvement les principes sous-jacents aux approches théoriques et informatiques qui sont, à ce jour, les meilleurs moyens de prédire ou d'étudier les voies de fusion ainsi que les niveaux énergétiques des différents intermédiaires de fusion impliqués.

Ensuite, nous décrirons les différents modèles de fusion de membranes lipidiques qui ont émergé de ces études théoriques et informatiques. Leurs étapes et les intermédiaires de fusion seront présentés.

Enfin, nous tenterons de recenser les principales estimations des énergies mises en jeu, évoquerons la multitude de paramètres pouvant les faire varier et expliquerons pourquoi nous avons choisi d'adopter une approche expérimentale dans cette étude.

1 Théorie et simulations

Si les expériences peuvent permettre de distinguer les phénomènes macroscopiques survenant lors de la fusion, il faut se reporter aux calculs théoriques ou aux simulations informatiques pour recueillir des informations sur les formes précises des intermédiaires de fusion, les mécanismes microscopiques mis en jeu, et les énergies respectives des différents intermédiaires.

L'approche théorique et les simulations informatiques n'apportent pas non plus les mêmes informations l'une et l'autre.

Les calculs théoriques permettent de modéliser une structure préalablement définie,

d'évaluer son niveau énergétique et de la modifier légèrement de façon à minimiser son énergie. Les modélisations informatiques se passent, quant à elles, d'hypothèses sur la nature et la séquence des intermédiaires de fusion et permettent de prédire l'existence de certaines structures et d'évaluer leurs niveaux respectifs d'énergie.

Ces deux types d'approche permettent toutes deux, néanmoins, d'étudier la fusion membranaire d'un point de vue énergétique.

Il est néanmoins important de noter que, dans les deux cas, on s'intéresse aux niveaux énergétiques respectifs d'intermédiaires réactionnels et non aux énergies d'activation de passage de l'un à l'autre. En faisant la différence entre les niveaux d'énergie de deux intermédiaires de fusion successifs, on obtient une sous-estimation de l'énergie d'activation du passage de l'un à l'autre. En effet, le passage d'un intermédiaire à l'autre peut faire intervenir un état transitoire dont le niveau énergétique est plus élevé que celui du deuxième intermédiaire.

De plus, à partir de ces estimations des énergies d'activation des sous-étapes de la fusion, il est difficile de remonter à une énergie d'activation globale de l'intégralité du processus de fusion.

1 .1 Approche théorique

Si la forme globale de l'intermédiaire réactionnel est postulée dans les grandes lignes, sa forme exacte peut être déterminée en optimisant sa structure pour que l'intégrale sur la surface de la densité d'énergie surfacique soit minimale. C'est le principe fondateur des études théoriques se penchant sur les arrangements et réarrangements membranaires.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, une bicouche lipidique peut être représentée schématiquement comme une phase fluide à deux dimensions. Les études théoriques reposent donc sur une description des membranes comme des milieux élastiques continus. Des propriétés macroscopiques moyennes permettent de caractériser le milieu à l'aide des trois déformations élémentaires que sont l'étirement, le cisaillement et la courbure (cf Figure 2.3).

L'étirement déforme la bicouche lipidique dans son plan, en modifiant sa surface. L'aire occupée par chaque lipide est donc modifiée. Si cette dernière est accrue, cela favorise l'accès de l'eau aux parties hydrophobes des lipides, ce qui est énergétiquement défavorable. Or, selon la composition lipidique, une bicouche lipidique se rompt à partir du moment où sa surface est augmentée de 1 à 5% de sa taille spontanée [33]. Il est donc extrêmement difficile d'étirer des membranes et cela n'arrive, de ce fait, pratiquement jamais. C'est pourquoi on ne considère en général pas l'étirement dans les estimations énergétiques des réarrangements de bicouches lipidiques même si le coût énergétique résultant serait énorme s'il avait lieu.

Le cisaillement correspond à une contrainte appliquée de manière tangentielle à la membrane. Il est nul car, dans le cas des bicouches lipidiques, il n'y a aucune résistance au cisaillement, du fait de leur caractère fluide.

La courbure correspond à une déformation de la membrane hors de son plan. Les lipides des feuillets interne et externe ne sont donc pas soumis à la même contrainte. Lorsque les têtes polaires de l'un sont écartées, celles de l'autre feuillet sont comprimées. L'énergie de courbure d'un système est donc évaluée comme la somme des énergies de courbure de ses deux monocouches [1].

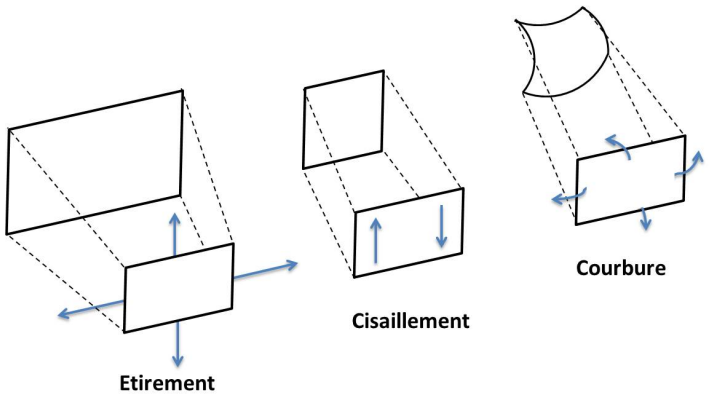


FIGURE 2.3 – **Représentation des trois déformations d'une membrane plane**.

De ces trois déformations élémentaires, seule la composante provenant de l'énergie de courbure est prise en compte dans les estimations énergétiques de la fusion membranaire ou de ses sous étapes. Les premières études théoriques portant sur la fusion membranaire minimisent donc l'énergie surfacique de courbure de la membrane [34, 35, 20].

L'énergie de courbure provient de la différence entre la courbure imposée à un lipide par la géométrie de la monocouche dans laquelle il est introduit et la courbure qu'adopterait spontanément une monocouche uniquement composée de ce type de lipides.

L'énergie de courbure surfacique d'une monocouche g_c est décrite par l'équation proposée par Helfrich en 1973 [36], dans le cadre de sa théorie sur l'élasticité de courbure des monocouches des membranes :

$$g_c = \frac{\kappa_m}{2}\left(C - C_0\right)^2 + \kappa_g k \tag{2.1}$$

où κ_m est le module de courbure moyenne de la monocouche, κ_g son module de courbure gaussienne, C est la courbure moyenne de la monocouche, k sa courbure gaussienne et C_0 sa courbure moyenne spontanée.

La courbure moyenne C est définie comme $C = \frac{C_1+C_2}{2}$ et la courbure gaussienne k comme $k = C_1C_2$, avec C_1 et C_2 les courbures principales définies par $C_i = \frac{1}{R_i}$, R_i étant les rayons principaux de courbure (cf Figure 2.4).

1. Il faut tout de même préciser que l'on obtient alors une surestimation de l'énergie totale, car les monocouches ne sont pas totalement indépendantes, et car des lipides peuvent être échangés ou transférés entre elles de façon à réduire l'énergie totale de la bicouche.

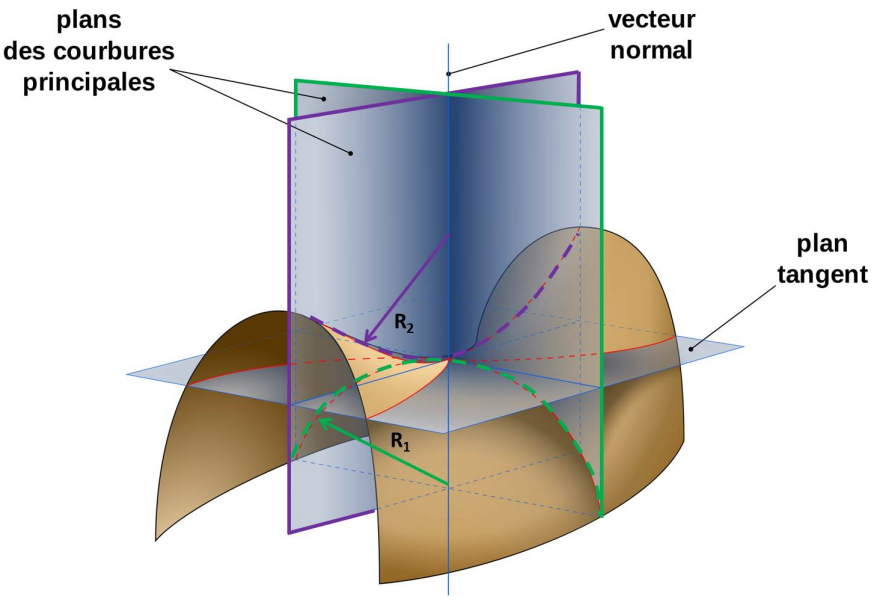


FIGURE 2.4 – **Représentation d'une surface et de ses deux courbures principales**. *Figure adaptée à partir d'une image réalisée par Eric Gaba pour https ://fr.wikipedia.org/wiki/Courbure*

L'énergie surfacique membranaire comprend en réalité une autre composante : l'énergie résultant de la présence d'interstices hydrophobes au cœur de la partie hydrophobe de la bicouche.

Ces interstices peuvent apparaître lorsque les deux feuillets des membranes adoptent des structures qui ne sont pas en adéquation, et qu'ils ont tendance à se décoller l'un de l'autre. Les lipides ont alors tendance à se déformer et à s'étirer pour combler ces espaces. Cette expansion diminue l'entropie du système et fait donc augmenter l'énergie de ce dernier.

C'est en 1993 que Siegel a montré qu'il fallait absolument en tenir compte dans l'étude des intermédiaires de fusion de bicouches lipidiques [21]. Avant 1993, cette composante avait déjà été prise en compte dans des études de systèmes lipidiques, en particulier sur la transition entre phase lamellaire et phase hexagonale inverse, dont Gruner a fait la revue en 1989 [37]. Il a donc été suggéré qu'une approche similaire suffise à décrire l'ensemble des intermédiaires lipidiques dont la structure est fondée sur des monocouches continues, donc qu'il pouvait être appliqué à l'étude de la fusion membranaire. C'est donc le modèle qui a été utilisé dans ce type d'étude par la suite [22, 24].

Pour déterminer le niveau énergétique de différents intermédiaires de fusion, il faut donc, dans un premier temps, avoir une idée du chemin réactionnel emprunté par les bicouches pour fusionner, afin de poser le problème et les équations en découlant. Ensuite, il faut minimiser l'intégrale de l'énergie surfacique du système, comprenant les composantes dues à la courbure de la membrane et à la présence d'interstices hydrophobes.

Ce type d'étude ne permet donc pas d'imaginer de nouveaux modèles ou de prédire l'existence d'un nouvel intermédiaire réactionnel potentiel, mais seulement d'estimer les énergies de structures déjà proposées.

1 .2 Simulations informatiques

Les simulations informatiques sont des approches numériques qui consistent à modéliser par calcul informatique l'évolution d'un système de particules au cours du temps. Le niveau de précision peut varier d'un modèle à une autre. Si les premières études modélisaient les lipides comme de petits bâtons, la dynamique moléculaire tous-atomes a été utilisée par la suite pour descendre au niveau des atomes pour la représentation des particules.

Le mouvement des particules les unes par rapport aux autres peut être obtenu en résolvant numériquement les équations de mouvement de Newton pour le système. Les forces impliquées entre les particules sont calculées en fonction de champs de force et de potentiels interatomiques.

Contrairement aux études théoriques, les simulations informatiques permettent de faire émerger de nouvelles séquences d'intermédiaires de fusion potentiels. En effet, on place les particules dans un champ de force et on les laisse évoluer ; des modèles peuvent donc émerger d'eux-mêmes. Néanmoins, il faut préciser que ces modèles ne sont pas non plus parfaits. Si les calculs théoriques nécessitent des hypothèses sur les structures des intermédiaires de fusion, les simulations numériques requièrent un choix du champ de force et, si certaines forces sont omises par soucis de simplification ou car elles ne sont pas connues, les prédictions sont également biaisées.

Les études de dynamique moléculaire tous-atomes ont l'avantage de très bien modéliser la réalité puisque tous les atomes sont représentés et elles permettent d'obtenir des informations à l'échelle du micromètre et de la milliseconde. Cependant, elles demandent une très importante puissance de calcul et il est donc nécessaire de limiter la simulation à un intervalle de temps court et à un nombre de particules restreint.

On voit bien qu'il faut trouver un compromis entre niveau de détails recherché et puissance de calcul requise. Il a ainsi été proposé d'introduire des *pseudo-atomes*, symbolisant des groupes d'atomes, afin de limiter les paramètres et de réduire ainsi les temps de calcul (cf Figure 2.5). On parle alors de simulation « gros grains ».

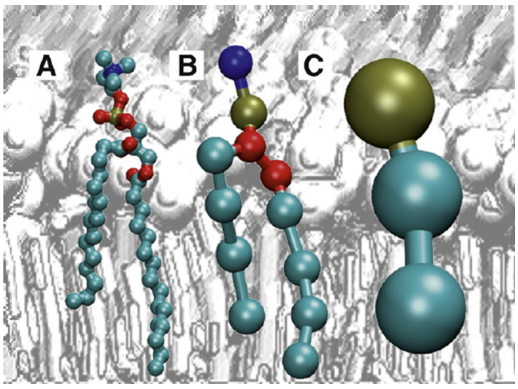


FIGURE 2.5 – **Différentes échelles de modélisation des lipides**. A : Tous les atomes sont représentés. B et C : Deux niveaux de simplification avec des « pseudo-atomes » de tailles différentes sont choisis. *Figure extraite de [38]*

En plus de leurs niveaux de précision de représentation des lipides respectifs, les simulations numériques diffèrent également par la représentation du solvant, la géométrie des systèmes étudiés et la façon dont la fusion est promue.

En effet, la fusion de membranes nécessitant un apport d'énergie, elle n'a généralement pas lieu spontanément à l'échelle temporelle à laquelle les simulations numériques sont réalisées. Plusieurs techniques existent pour favoriser la fusion : la déshydratation partielle des lipides, l'ajout d'une force externe poussant les membranes l'une vers l'autre *etc.*

De même, les premières études modélisent deux bicouches planes avec des conditions aux bords cycliques pour simplifier les calculs. La bicouche traversant l'intégralité de la boîte de simulation, elle sépare le volume modélisé en deux zones ne pouvant pas communiquer. Par la suite, des géométries courbées ont été ajoutées, en particulier afin de permettre des échanges de solvant entre la zone comprise entre les membranes et l'extérieur.

Il existe bien d'autres différences entre toutes les simulations, ce qui ne rend pas leur comparaison aisée, et peut expliquer les différentes prédictions obtenues par les simulations. Quand différentes simulations convergent vers un même modèle, en revanche, cela leur donne encore plus de poids.

La prochaine section a pour but de faire un récapitulatif des différents modèles de fusion de bicouches lipidiques ayant été développés par la communauté scientifique grâce à l'ensemble des résultats expérimentaux, théoriques et informatiques.

2 Étapes théoriques de la fusion

Comme nous l'avons vu, les membranes biologiques ne sont pas uniquement constituées d'une bicouche lipidique mais, du fait de la structure même des membranes, il est probable que nous ne parvenions pas à comprendre les mécanismes par lesquels les protéines déclenchent la fusion membranaire avant d'élucider ce qui se passe au niveau des bicouches lipidiques lors de leur fusion.

De plus, la nécessité de l'apposition des membranes lors de la fusion nous laisse à penser que la majorité des protéines qui participent à la gêne stérique empêchant le rapprochement de deux membranes en temps normal, sont évacuées de la zone de fusion avant le début du processus [39].

Les étapes de la fusion de membranes purement lipidiques seront présentées, comme première approche à la compréhension de la fusion de membranes biologiques réelles.

Le long du déroulement de la fusion, plusieurs processus doivent avoir lieu, parfois en parallèle : apposition des bicouches lipidiques, perturbation des interfaces lipide/eau, déplacement de certaines parties hydrophobes dans le milieu aqueux. Pris isolément, chacun requiert une énergie de l'ordre de quelques k_BT par molécule impliquée.

Pour former un pore de fusion, la structure de la membrane doit être altérée sur un rayon d'au moins 4 nm [21], ce qui correspond à peu près à la largeur de la bicouche lipidique. Cela fait donc intervenir environ 300 lipides. Si toutes ces molécules étaient simultanément

impliquées dans des réarrangements, les énergies correspondantes seraient énormes. C'est pourquoi l'existence d'étapes intermédiaires, faisant chacune intervenir moins de molécules, et ayant ainsi des énergies d'activation moindres, a été proposée [21].

Depuis maintenant des décennies, la communauté scientifique tente d'élucider la séquence d'événements et de structures menant deux bicouches distinctes à former une seule structure continue. Différents modèles de fusion ont été proposés.

Tous impliquent, dans un premier temps, une phase d'approche et de déshydratation de la zone de contact. Par la suite, la fusion est initiée, d'une manière ou d'une autre selon le modèle, mais donne toujours naissance à un intermédiaire de fusion nommé *stalk*. Enfin, un pore de fusion est ouvert, directement après la formation du *stalk* ou après une expansion de ce dernier, selon les modèles.

Dans cette partie, nous présenterons les différents modèles de fusion de membranes purement lipidiques, ainsi que les intermédiaires de fusion, qui ont sûrement des points communs avec ceux impliqués lors de la fusion membranaire biologique.

Nous verrons cependant, par la suite, qu'il n'existe en fait *a priori* pas un seul mode de fusion, ni une structure unique pour chaque intermédiaire, du fait de la complexité du système. Néanmoins, comme première approche de la fusion membranaire et de ces aspects énergétiques, la compréhension de ces modèles est nécessaire.

2 .1 Approche des membranes et répulsion d'hydratation

Initialement, deux membranes peuvent être séparées d'environ 10 à 20 nanomètres à cause de la répulsion électrostatique pouvant exister entre elles [40] et de la gêne stérique résultant de l'éventuelle présence de protéines membranaires. Une autre source de répulsion entre les membranes existe : elle résulte du fait que les bicouches lipidiques ondulent selon une direction normale à la bicouche [41], et que cela participe également à la gêne stérique empêchant les bicouches de se rapprocher. Ces ondulations sont supprimées lorsque les bicouches sont suffisamment proches l'une de l'autre [42].

À cette distance, les forces de van der Waals attirent les membranes l'une vers l'autre.

Pour fusionner, les membranes doivent donc, dans un premier temps, être rapprochées l'une de l'autre.

Lorsque la distance séparant les membranes diminue, une nouvelle force apparaît : c'est la répulsion d'hydratation [43, 44]. Elle provient du caractère polaire de la tête des lipides et de la « couche d'hydratation » qui en résulte. Il existe, en effet, des molécules d'eau très fortement liées aux têtes des lipides et un apport d'énergie est nécessaire pour s'en débarrasser et que l'apposition des deux bicouches soit possible.

Cette répulsion existe pour toute surface hydrophile, et décroît de façon exponentielle avec la distance, avec une constante de décroissance de l'ordre de 0,1 à 0,4 nm, en fonction de la nature de la surface [43]. Elle devient très forte lorsque les membranes sont espacées d'environ 4 nm et, lorsque cette répulsion compense exactement les forces attractives, on

obtient un état d'équilibre qui maintient en général deux membranes en regard séparées d'une distance de l'ordre de 2 à 3 nanomètres [43], préservant ainsi leur intégrité.

In vivo, ce sont des protéines qui apportent l'énergie nécessaire pour rapprocher les membranes l'une de l'autre.

In vitro, de nombreuses techniques ont été élaborées pour remplacer le travail de ces protéines, et approcher les deux membranes. Nous ne les référencerons pas toutes mais en présenterons brièvement quatre.

Une première technique consiste à ajouter du polyéthylène glycol (PEG) dans le milieu. Il a été montré que ce polymère entraînait la fusion cellulaire [39] après avoir causé leur agrégation par l'intermédiaire de la déplétion. La déplétion résulte du fait que le PEG, dont le volume est important, puisse être exclu de la zone entre les membranes du fait de l'agitation thermique. Si c'est le cas, une force osmotique, résultant de la différence de concentration de PEG entre la zone comprise entre les membranes et l'extérieur, pousse les membranes l'une vers l'autre.

Une autre possibilité est d'incorporer des lipides chargés négativement dans les bicouches lipidiques et des cations Ca^{2+} dans le milieu aqueux [45]. Le mécanisme n'est pas encore parfaitement compris mais pourrait impliquer des ponts faits entre les membranes par l'intermédiaire d'ions calcium liés à un lipide chargé négativement de chacune des membranes. Les ions calcium pourraient aussi lier des lipides de la même membrane et engendrer une réorganisation des lipides sur la membrane, et la formation de domaines de compaction différente dont un type pourrait favoriser la fusion [46].

Contrôler le niveau d'hydratation de l'échantillon peut également permettre de rapprocher deux membranes l'une de l'autre. Une phase lamellaire de lipides va voir sa distance inter-membranaire diminuer si la quantité d'eau est assez réduite [47].

Des liens capables de lier deux vésicules l'une à l'autre peuvent également favoriser leur interaction. C'est le cas de fragments complémentaires d'ADN (simples brins) qui, ancrés sur deux membranes, les attachent et les maintiennent proches en s'hybridant [48].

In silico, les membranes peuvent être rapprochées par l'ajout de champs de forces divers, replaçant le travail des protéines *in vivo*.

L'étape d'approche des membranes est donc peu étudiée dans les simulations informatiques car elle est forcée pour que la cinétique de rencontre soit accrue et que la fusion puisse être étudiée dans le temps imparti par la simulation.

La suite des étapes de fusion sont, quant à elles, plus étudiées car elles découlent directement de l'apposition des membranes.

2 .2 Approche localisée des bicouches

La répulsion d'hydratation est proportionnelle à la surface membranaire impliquée. Il a donc été proposé en 1987 par Leikin que l'approche des membranes se fasse de façon très localisée, par l'intermédiaire de protubérances (cf Figure 2.6b) résultant de fluctuations thermiques de la membrane hors de son plan [49].

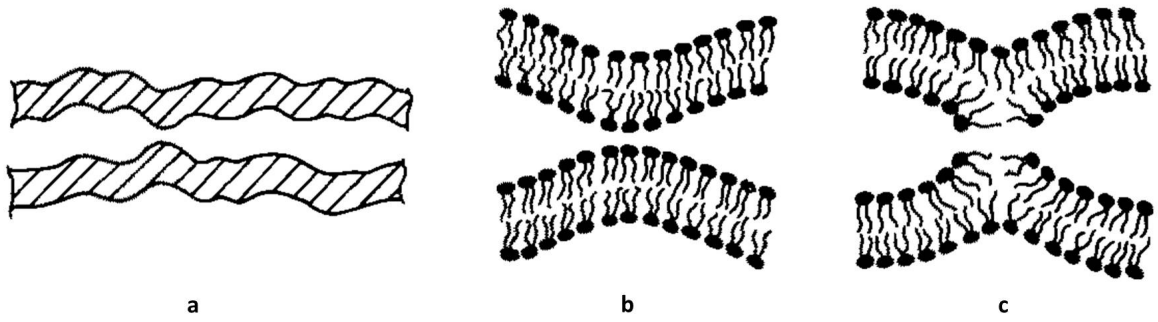


FIGURE 2.6 – **Approche localisée des membranes et nucléation de la fusion**. (a) Représentation macroscopique de la forme d'une membrane fluctuant sous l'effet de l'agitation thermique. (b) Représentation microscopique de la membrane et d'une protubérance résultant des fluctuations thermiques des lipides hors du plan de la membrane. Malgré la répulsion d'hydratation, un rapprochement local des deux bicouches peut avoir lieu au niveau de ces ondulations. (c) La forte répulsion d'hydratation engendrée entraîne l'écartement des têtes polaires en regard. Il en résulte alors l'exposition de parties hydrophobes qui peuvent s'attirer entre elles et constituer un point de nucléation de la fusion. *Figure adaptée de [49]*

Ces protubérances permettraient ainsi aux membranes d'être très localement rapprochées jusqu'à environ 0,5 nm l'une de l'autre, alors que la distance moyenne séparant les membranes resterait de l'ordre des trois nanomètres existant à l'équilibre (cf Figure 2.6b).

In vivo, ce boursouflement des membranes pourrait être le résultat de l'action de certaines protéines, étant donné que c'est un processus qui requiert un important apport d'énergie [22]. Néanmoins, elles peuvent également être le résultat de simples fluctuations thermiques, mais de façon moins efficace bien entendu [2]. De telles structures ont été observées expérimentalement [50].

La répulsion entre les membranes est donc amoindrie par la présence de ces ondulations par rapport à une situation où l'intégralité de la membrane se serait rapprochée, ce qui offre la possibilité d'une approche très localisée.

Restant néanmoins très élevée, cette répulsion aurait alors pour conséquence d'éloigner les têtes polaires de la zone de plus proche contact. Les têtes s'écarteraient alors les unes des autres [49], créant ainsi des zones d'accès aux parties hydrophobes des lipides (cf Figure 2.6c). Il apparaîtrait alors une force d'attraction hydrophobe entre ces régions, constituant ainsi un potentiel point de nucléation de la fusion (cf Figure 2.6c). Ces régions exposées ont par la suite été nommées « semi-stalks » [51] en référence au fait qu'elles puissent engendrer la création d'un *stalk* - intermédiaire de fusion retrouvé dans les différents modèles de fusion - en se rejoignant. Nous reviendrons plus précisément sur cet intermédiaire de fusion dans la section 2 .4.

2. Cela permet que la fusion soit nucléée spontanément dans les simulations, si les conditions sont favorables.

2 .3 Conformation étendue des lipides

En 1992, Kinnunen suggère que certains lipides puissent adopter une conformation peu courante, dite conformation étendue [52], ou *splay* en anglais. Ces derniers ne présenteraient pas comme d'habitude leurs deux queues hydrophobes parallèles entre elles mais elles pointeraient plutôt dans deux directions opposées (cf Figure 2.7). Cela leur permettrait potentiellement d'être incorporées dans deux bicouches en regard en même temps, leur tête polaire restant à l'interface.

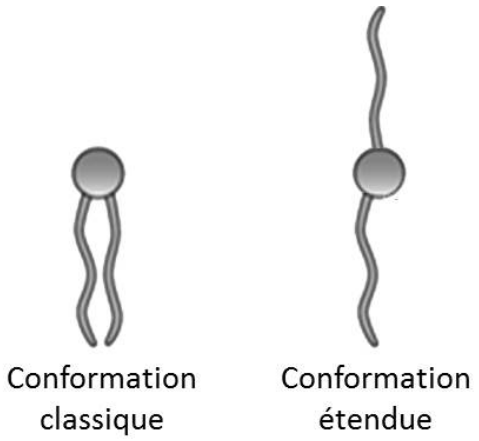


FIGURE 2.7 – **Conformations normale et étendue d'un lipide**. Plutôt que de rester globalement parallèles entre elles, les chaînes carbonées des lipides en conformation étendue pointent dans deux directions opposées.

Récemment, de plus en plus de résultats découlant de simulations numériques laissent à penser que la première étape, et sûrement l'étape du processus qui demande le plus d'énergie, consisterait en la formation de cette conformation étendue d'un lipide pour initier la fusion [53]. Il a par exemple été montré que, dans un état partiellement déshydraté, la cinétique de fusion membranaire précoce était gouvernée par le niveau énergétique d'une conformation impliquant l'exposition au solvant de queues hydrophobes (ou « pré-stalk ») et non par l'énergie du *stalk* lui-même [30].

A l'heure actuelle, il n'est cependant pas clair si un seul lipide serait complètement étendu et incorporé en même temps dans les deux bicouches en regard, comme il l'a été initialement suggéré, ou bien si deux lipides provenant chacun d'une des bicouches seraient partiellement étendus, une de leur chaîne carbonée sortant de leur bicouche mais n'étant pas incorporée dans la bicouche d'en face (cf Figure 2.8). Dans ce deuxième cas, suggéré par des simulations réalisées par Stevens [54], les deux chaînes carbonées exposées pourraient s'associer pour former une poche hydrophobe entre les bicouches. Cela serait potentiellement à partir de cette zone que pourrait être nucléé le prochain intermédiaire de fusion : le *stalk*. En effet, il a été montré dans une simulation que lorsqu'une des queues insaturée d'un lipide était sortie d'une bicouche de POPC, une connexion entre les bicouches, initialement stables, était créée dans la nanoseconde [30].

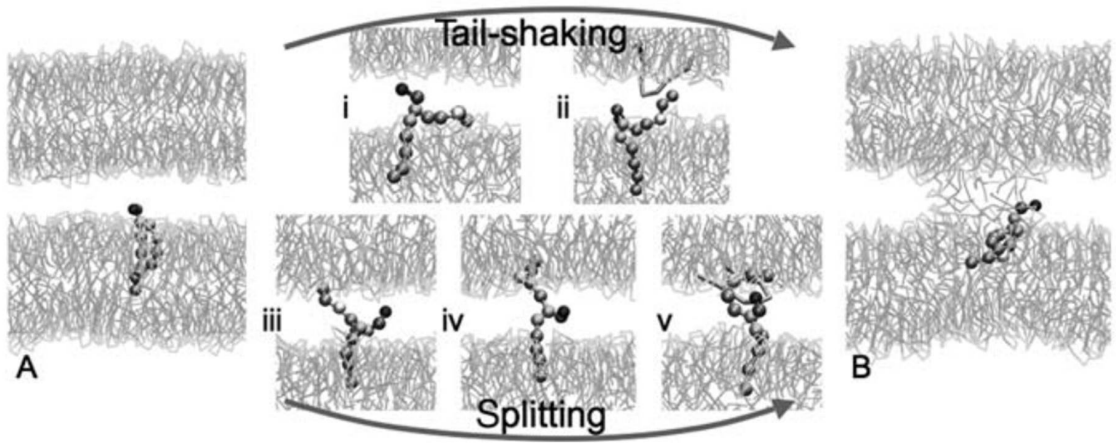


FIGURE 2.8 – **Nucléation de la fusion et conformation étendue des lipides**. Si la conformation étendue des lipides est maintenant reconnue comme étant primordiale à la nucléation de la fusion, il n'est pas facile de déterminer si un ou plusieurs lipides sont initialement mis en jeu. (haut) Deux lipides sortent une de leurs chaînes hydrophobes qui s'associent entre les bicouches. (bas) Un seul lipide adopte une conformation étendue, et incorpore sa queue hydrophobe dans la bicouche en face. *Figure extraite de [53].*

2 .4 Du *stalk* à l'ouverture du pore de fusion

Le modèle de la « tige », ou le *stalk* en anglais, est le premier intermédiaire de fusion à avoir été reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique. C'est un pont métastable joignant les deux membranes, composé de lipides provenant des feuillets externes des membranes sur le point de fusionner (dits feuillets « cis »), tandis que les monocouches internes (dites « trans ») sont intactes (cf Figures 2.9 et 2.10 C). Les contenus des deux compartiments sont donc toujours séparés.

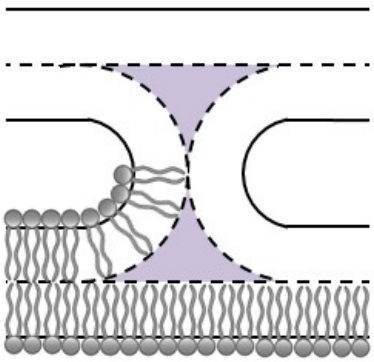


FIGURE 2.9 – **Structure du *stalk*.** Les deux feuillets externes (*trans*) ont fusionné mais les feuillets internes (*cis*) restent intacts. Siegel soulèvera qu'il existe des zones « vides » (surfaces violettes) très coûteuses en énergie.

Cette structure a initialement été décrite par Gingell et Ginsberg [55] en 1978, puis proposée comme étant le premier intermédiaire de fusion par Hui [56] en 1981. Par la

suite, l'évocation de l'existence d'un tel intermédiaire est retrouvée dans de nombreuses études [34, 35, 57, 20].

En 1993, Siegel montre que le *stalk*, tel qu'il a été proposé initialement [35], fait intervenir des espaces « vides », ou interstices hydrophobes (cf Figure 2.9), beaucoup trop coûteux en énergie pour que la fusion procède par cette voie [21].

De nombreux modèles voient alors le jour, modifiant légèrement la géométrie du *stalk* ou les degrés de liberté des lipides [23, 24], mais conservant globalement sa topologie telle qu'elle avait été proposée initialement : les feuillets externes fusionnent et forment une structure semblable à celle d'un sablier, tandis que les feuillets internes sont encore distincts. Les corrections apportées au fur et à mesure à ce modèle sont répertoriées dans l'Annexe B.

Le modèle du *stalk* est sûrement le modèle qui a été le plus étudié et, même s'il a fait l'objet de nombreux ajustements, il reste l'intermédiaire le plus accepté dans le processus de la fusion membranaire.

Cela est d'autant plus vrai depuis que son existence a été prédite par des simulations numériques [58, 59, 60, 61] et l'observation par diffraction de rayons X d'une phase de phospholipides où apparaissent pour certaines compositions lipidiques, dans des conditions d'hydratation basse, des structures stables similaires aux *stalks* [47].

De plus, ce modèle permet d'expliquer qualitativement l'influence de la composition lipidique sur les taux de fusion [62]. En effet, l'ajout de lipides à géométries variables dans le feuillet externe des membranes favorise ou inhibe la fusion en fonction de l'adéquation entre la courbure intrinsèque du lipide et celle du *stalk*.

Si l'existence d'une structure de type *stalk* est maintenant globalement acceptée par tous comme étant la première étape de la fusion, et l'ouverture d'un pore comme étant la dernière, il existe plusieurs hypothèses sur les chemins empruntés par les bicouches pour passer de l'un à l'autre.

Une des voies de transition possible du *stalk* vers le pore de fusion commence par son expansion radiale, concomitante avec un boursouflement des monocouches *trans* l'une vers l'autre [35]. Un contact entre les monocouches *trans*, ou *transmonolayer contact* (TMC) en anglais, est alors formé (cf Figure 2.10 D).

Si le *stalk* continue à s'étendre radialement et que le contact devient plus grand que l'épaisseur de la bicouche, on forme alors une nouvelle bicouche appelée « diaphragme d'hémifusion » [35] (cf Figure 2.10 E).

Pour que la fusion ait lieu, il faut qu'il y ait ouverture d'un pore de fusion dans ce diaphragme (cf Figure 2.10 F).

Les fluctuations thermiques produisent sans cesse de petits trous vacillants dans la membrane. Ces pores sont hydrophobes car la zone est cerclée par les queues hydrophobes des lipides.

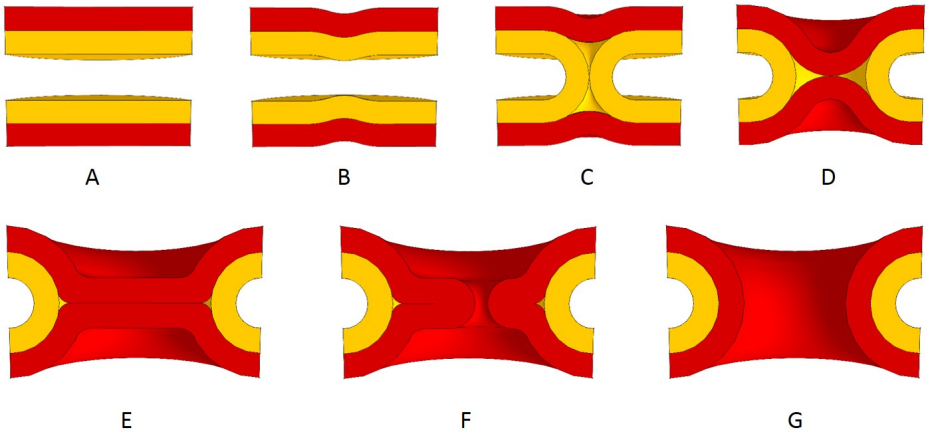


FIGURE 2.10 – **Modèle d'extension du *stalk* par expansion radiale**. Le *stalk* (C) s'élargit radialement et les monocouches *trans* entrent en contact (D). Le contact peut alors s'étendre pour donner naissance à un diaphragme d'hémifusion (E), dans lequel un pore peut être ouvert (F). *Figure réalisée par Benjamin Ravaux.*

Ces derniers peuvent potentiellement se transformer en pores hydrophiles si certains lipides se ré-agencent pour présenter leurs têtes polaires au milieu aqueux environnant et former un canal hydrophile [63] (cf Figure 2.11). Ce réarrangement est possible seulement si le rayon du pore atteint une taille de l'ordre de l'épaisseur de la bicouche lipidique [3]. Par la suite, on parlera de « trou » pour nommer un pore hydrophobe, et de « pore » lorsqu'il est hydrophile.

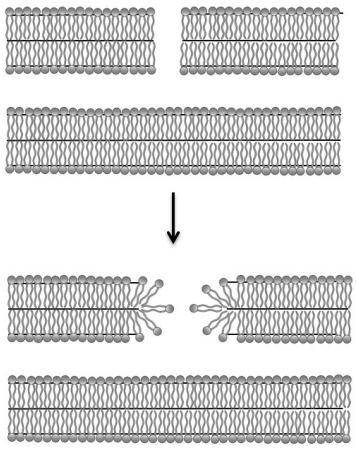


FIGURE 2.11 – **Transformation d'un trou hydrophobe en pore hydrophile**. Lors de la formation d'un trou, les lipides peuvent se ré-agencer pour présenter leurs têtes hydrophiles au milieu aqueux.

Si le rayon d'un pore dépasse un rayon critique, le pore s'agrandit indéfiniment. Ce phénomène est dû au fait que la tension de surface - qui tend à faire diminuer la surface de la membrane donc à agrandir le pore - diminue quadratiquement avec le rayon, tandis

3. En effet, il faut qu'il y ait la place d'avoir deux monocouches ainsi que l'espace inter-membranaire minimal qui vaut environ deux nanomètres, du fait de la répulsion d'hydratation.

que la tension de ligne - qui tend à faire décroître la circonférence du pore donc à refermer celui-ci - augmente linéairement avec le rayon. Au-delà d'un certain rayon, la tension de surface l'emporte donc sur la tension de ligne et le pore s'agrandit sans limite [63].

Ainsi, lorsqu'un pore est formé dans le diaphragme d'hémifusion et que son rayon est supérieur au rayon critique, ce dernier s'étend et la fusion est accomplie. Si le pore peut être créé n'importe où dans le diaphragme, comme on vient de le décrire, il a été montré qu'il était plus probable qu'il soit nucléé sur les bords du diaphragme [25]. Ceci résulte du fait que la tension de surface soit accrue dans sa périphérie à cause des contraintes de courbure et d'inclinaison des lipides dans cette région.

L'énergie requise pour former un diaphragme d'hémifusion étant très importante, Siegel proposa en 1993 que la fusion se fasse par ouverture directe d'un pore à partir du contact localisé entre les monocouches *trans* [21].

Cet autre modèle de fusion, ne faisant pas intervenir d'hémifusion étendue - type diaphragme d'hémifusion, est aussi proposée par Kuzmin en 2001 [22], et par Kasson en 2006 [60].

Un troisième mécanisme de fusion [58] est découvert par Müller en 2002, d'après ses résultats de simulations numériques fondées sur un algorithme de Monte-Carlo. Au lieu de s'étendre de façon radiale, le *stalk* se propage de façon anisotrope, le long d'un chemin circulaire (cf Figure 2.12 D). Müller montre également que la formation d'une connexion étendue entre les bicouches déstabilise ces dernières et entraîne la formation de multiples trous transitoires en son voisinage, ce qui favorise la nucléation de pores.

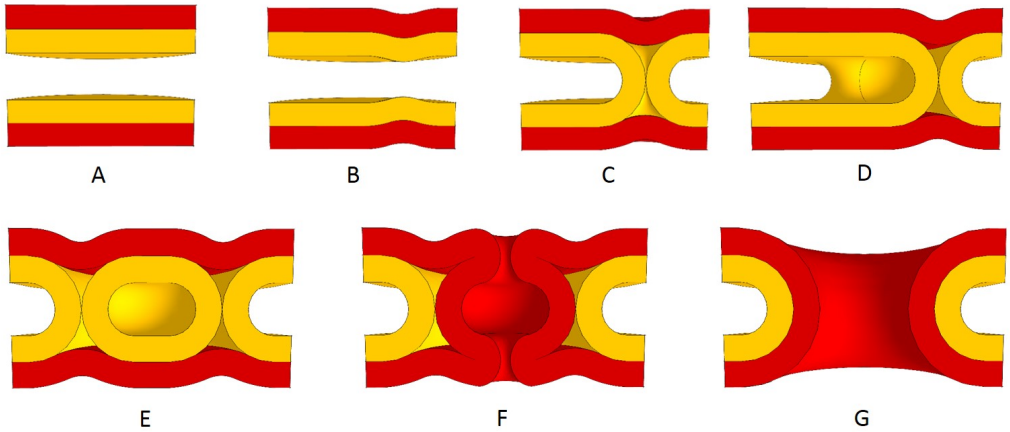


FIGURE 2.12 – **Modèle d'extension du *stalk* par expansion anisotrope**. Le *stalk* (C) s'élargit le long d'un chemin circulaire (D) jusqu'à rejoindre son point de départ (E). Deux pores doivent être ouverts dans les bicouches (F) pour que la fusion soit accomplie. La connexion étendue entre les deux bicouche favorisant l'apparition de pores, ces derniers peuvent apparaître avant que le *stalk* ne rejoigne son point de départ. La fusion est donc accompagnée de fuites qui ne sont pas cantonnées au petit compartiment aqueux créé par le stalk anisotrope. *Figure réalisée par Benjamin Ravaux.*

Le *stalk* peut continuer à se propager circulairement jusqu'à rejoindre son point de départ et former un petit compartiment aqueux entre les bicouches, ayant la structure d'une micelle inverse (cf Figure 2.12 E). Cette structure correspond aux « particules lipidiques » et aux micelles inverses enchâssées dans des bicouches lipidiques qui avaient été observées expérimentalement et proposées comme potentiels intermédiaires de fusion par Verkleij [4] [65]. En dehors de la connexion circulaire, les membranes sont intègres ; un pore doit donc être ouvert dans chacune des membranes pour que la fusion soit finalisée (cf Figure 2.12 F). Ces pores apparaissent assez facilement car leur nucléation est promue par la proximité du *stalk* étendu.

Le *stalk* favorise l'apparition de trous dans son voisinage donc il se peut que des trous soient nucléés avant que le *stalk* n'ait rejoint son point de départ. Il continue alors à se propager, en entourant les trous, pour former le petit compartiment fermé entre les membranes (de type micelle inverse), qui joue le rôle de sas, prévenant la perte totale du contenu des compartiments maintenant ouverts sur l'extérieur. Ce type de fusion est tout de même accompagné de fuites.

3 Complexité d'une étude énergétique

Les différents chemins empruntés par les membranes pour fusionner présentent de nombreuses caractéristiques communes : approche et déshydratation, connexion entre les monocouches externes, puis continuité des volumes initialement enfermés par les membranes.

Les approches théoriques et informatiques ont d'ailleurs permis, dans les dernières décennies, de développer plusieurs modèles généraux de fusion membranaire. Le modèle du *stalk* et ses variantes - différant par sa nucléation et son mode d'expansion avant l'ouverture finale du pore de fusion - en sont le résultat.

Cependant, les prédictions énergétiques restent très difficiles à faire.

Cela peut être dû à la multiplicité de paramètres pouvant influencer la fusion d'une quelconque manière. À titre d'exemple, la géométrie des lipides peut faire varier drastiquement le comportement global de la bicouche lipidique en cas de déstabilisation. L'hypothèse qu'elle puisse également influencer le mode de fusion des membranes lipidiques ainsi que les barrières énergétiques rencontrées émerge alors assez naturellement.

De plus, il ne serait pas impossible que la complexité du système suffise à pouvoir lui faire emprunter plusieurs modes de fusion. La multitude de lipides mis en jeu pourrait même laisser à penser qu'il puisse exister autant de modes de fusion que de lipides impliqués dans le processus, et qu'ils puissent être suivis totalement aléatoirement.

Et quand bien même un seul mode de fusion serait emprunté pour un ensemble de conditions fixées, il est difficile d'imaginer qu'il existe une série discrète de structures lipidiques bien définies le long du chemin de la fusion pour un système si complexe. À titre d'exemple, le *stalk* est une structure très propre, symétrique autour de son axe ainsi que par rapport au plan équidistant et parallèle aux deux bicouches. Il a été suggéré qu'un tel degré de

4. Depuis, ces structures ont également été mises en évidence dans une simulation lorsque la courbure spontanée des lipides est assez négative [64].

symétrie soit en réalité peu probable pour un état transitoire [30]. Globalement, peut-être qu'il faudrait simplement, pour que la fusion ait lieu, que les monocouches externes soient au moins localement assemblées dans un premier temps. Le *stalk* est seulement l'exemple le plus simple et parfait d'une telle connexion. De même, les deux monocouches internes doivent être à leur tour au moins localement réunies, et le pore de fusion n'est sûrement qu'une des structures possible permettant un tel assemblage.

Enfin, il est important de rappeler que, les bicouches lipidiques étant en phase fluide, tout fluctue et la « forme » des intermédiaires dont nous parlons, si ces derniers existent, correspond en réalité à un agencement moyen de particules. Les structures de tels intermédiaires ne peuvent donc être parfaitement définies.

Tous ces facteurs rendent particulièrement difficile l'étude de la fusion membranaire de tous les points de vue, y compris énergétique.

Nous nous pencherons donc, dans un premier temps, sur les effets de la nature des lipides, de la température et du niveau d'hydratation, sur la stabilité des intermédiaires de fusion classiques. Nous nous focaliserons en particulier sur le *stalk* et le pore de fusion. En effet, même s'ils ne sont sûrement pas aussi bien définis en réalité, les intermédiaires réels présentent probablement un certain nombre de caractéristiques communes avec eux, en particulier leur courbure.

Nous tenterons ensuite de faire un bref historique de quelques-unes des nombreuses estimations énergétiques ayant trait à la fusion.

Nous présenterons enfin, brièvement, en quoi une étude expérimentale peut apporter certaines réponses complémentaires à la problématique de la fusion membranaire, en particulier pour les questions énergétiques concernant un système si complexe.

3 .1 Impact de certains paramètres sur la fusion

Les interactions entre les lipides, gouvernant la stabilité des bicouches, régissent en grande partie leur comportement en cas de déstabilisation. Si de nombreux événements de fusion requièrent un apport d'énergie, la quantité nécessaire peut varier avec ces interactions, et donc avec la nature des lipides la bicouche (géométrie, charges, *etc.*).

De telles interactions sont très fortement dépendantes du milieu environnant (hydratation, température *etc.*) ainsi que de l'état global de la membrane (courbure *etc.*). La fusion peut donc être également très fortement influencée par ces paramètres. Ainsi, elle peut être facilitée ou inhibée, si la membrane est déstabilisée ou stabilisée. Et, si la fusion est possible, c'est un mode de fusion lui-même qui pourrait potentiellement être favorisé au détriment d'un autre.

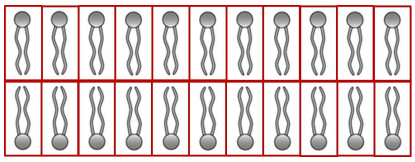
3 .1.1 Composition lipidique

Nous avons vu dans le Chapitre 1 que les lipides pouvaient avoir des géométries variables, et que cela pouvait avoir une influence sur la façon dont ils s'organisaient spontanément en milieu aqueux (bicouches planes, micelles, *etc.*).

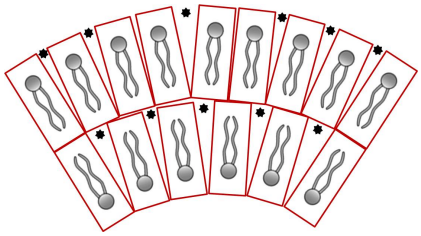
De plus, nous avons vu que certains paramètres extérieurs (température, niveau d'hydratation, pH) pouvaient modifier la géométrie effective des lipides, donc également leur agencement dans l'eau.

Dans le cas le plus simple d'une membrane plate composée de lipides de forme cylindrique, ces derniers sont très adaptés à la géométrie de la bicouche (cf Figure 2.13a). Ces entités sont donc très stables et la fusion de telles membranes, nécessitant leur déstabilisation, est de ce fait difficile.

Si l'on commence cependant à trop courber la membrane (à l'échelle du lipide, c'est-à-dire si la vésicule a une taille inférieure à environ 100 nm de diamètre), celle-ci va être déstabilisée. En effet, les lipides cylindriques n'ont plus la géométrie optimale (cf Figure 2.13b) et la bicouche a un niveau énergétique très élevé. Il sera alors potentiellement plus facile de la faire fusionner.



(a) **Bicouche lipidique plate composée de lipides cylindriques**. Si la courbure intrinsèque du lipide correspond à la courbure de la bicouche lipidique, cette dernière est très stable.



(b) **Bicouche lipidique de courbure non nulle composée de lipides cylindriques**. Si la courbure intrinsèque du lipide ne correspond pas à la courbure de la bicouche lipidique, des zones d'accès aux parties hydrophobes, ou défauts apparaissent (étoiles noires). La membrane est, de ce fait, plus facilement déstabilisée.

FIGURE 2.13 – **Bicouches composée de lipides cylindriques.**

Leikin a suggéré que des protubérances faisant apparaître des zones d'accès aux parties hydrophobes puissent promouvoir la naissance du *stalk* [49]. L'existence intrinsèque d'une densité de défauts accrue pourrait potentiellement, de la même façon promouvoir la fusion en favorisant sa nucléation.

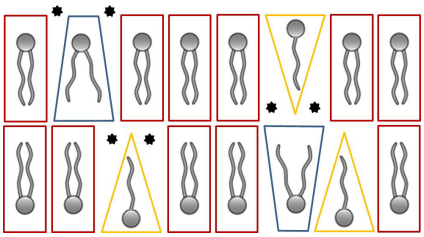
En réalité, plus que la forme des lipides ou la courbure de la membrane, c'est la corrélation entre ces deux paramètres qui joue réellement un rôle sur la stabilité des membranes.

En cas de mélange de lipides, on peut former des bicouches lipidiques contenant des lipides qui ne formeraient pas de phase lamellaire s'ils étaient seuls. Ils vont être forcés à adopter une courbure qui ne correspond pas à leur courbure spontanée. Cela introduit donc des défauts et contribue à déstabiliser la membrane (cf Figure 2.14a), tout comme courber une membrane de lipides cylindriques la déstabilise. La fusion semble, là aussi, facilitée.

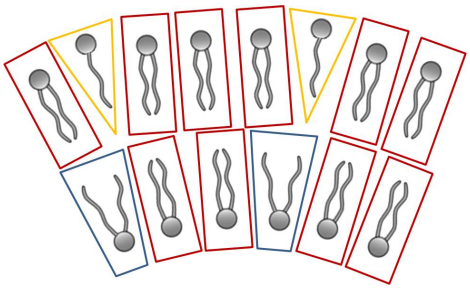
Si la bicouche lipidique est courbée, en revanche, il peut y avoir une réorganisation des lipides entre les deux feuillets [5], afin que chaque type de lipide soit sur le feuillet le

5. Le « flip-flop », échange de lipides entre les feuillets, a lieu dans toutes les membranes et n'est, en

plus adapté à sa courbure spontanée (cf Figure 2.14b). Cela peut donner naissance à une bicouche asymétrique, qui est plus stable que si la répartition des lipides non cylindriques était homogène. La bicouche résultante est donc moins fusogène qu'avant la réorganisation des lipides.



(a) **Bicouche lipidique plane comprenant des lipides de courbure spontanée non nulle**. Les lipides non cylindriques n'ont pas une géométrie adaptée à une conformation en bicouche plane. C'est d'ailleurs pour cela que, seuls, ils ne forment pas de bicouche. Leur présence déstabilise la membrane en faisant apparaître des défauts. On précise que, les bicouches lipidiques étant en phase fluide, tout fluctue et les défauts représentés ici bougent également et sont ainsi statistiquement répartis partout dans la bicouche. Les défauts résultant de la présence des lipides à grosse tête, représentés dans le cœur de la bicouche, déstabilisent donc autant cette dernière que les défauts exposés.



(b) **Bicouche lipidique courbe dont la composition lipidique est asymétrique**. Dans le cas d'une bicouche courbe, les lipides se placent préférentiellement sur un feuillet ou l'autre afin d'adopter la courbure la plus proche de leur courbure spontanée. Les lipides de forme conique se situent préférentiellement sur le feuillet externe tandis que ceux présentant une géométrie conique inverse sont sur le feuillet interne. Cela réduit le nombre de défauts et stabilise la membrane.

FIGURE 2.14 – **Bicouches composées de lipides de différentes géométries.**

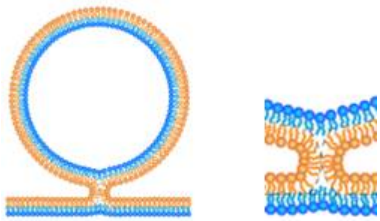
L'adéquation ou non entre courbure de la membrane et courbure spontanée des lipides est donc primordiale pour la stabilité des bicouches. Si la courbure de la membrane et le nombre de lipides de chaque type permettent à chacun d'entre eux d'adopter sa courbure spontanée, on peut imaginer que l'effet de l'ajout de tels lipides soit nul. Cependant, il est pratiquement impossible de prévoir s'il y aura ou non adéquation des courbures, et donc si l'ajout de tel ou tel lipide déstabilisera ou non la membrane.

En présence de lipides à géométrie non cylindrique, le fait d'avoir une bicouche courbée peut potentiellement permettre la ségrégation des lipides et limiter les défauts. En plus de la potentielle propension à déstabiliser la membrane en soi, ce type de géométrie a également un autre effet sur la fusion des membranes.

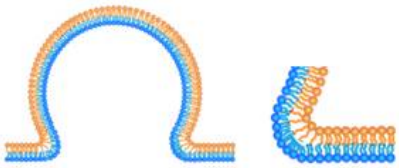
En effet, lors de la fusion, presque tous les modèles prédisent l'existence du *stalk* et

général, pas directionnel. Ici, lorsqu'un lipide arrive par hasard dans le feuillet qui lui convient le mieux, la probabilité qu'il en parte est amoindrie, et cela permet la ségrégation des lipides. La cinétique de ce processus est très lente par rapport aux autres mouvements des lipides (rotation autour de son axe, diffusion latérale sur le feuillet), du fait du caractère coûteux en énergie du passage des têtes polaires à travers le cœur hydrophobe de la bicouche (de l'ordre de $35k_BT$ par lipide, dans le cas du DOPC).

du pore de fusion, deux structures localement très courbées. Si l'on imagine que les intermédiaires réels ne sont pas ceux-là, ils présentent néanmoins, eux aussi, des courbures importantes à certains endroits. L'énergie de ces structures dépend donc de la capacité des monocouches impliquées à être courbées dans le sens requis [66], et donc de la composition lipidique des feuillets. Il se peut, de cette manière, que la présence de lipides non cylindriques favorise ou non l'apparition de certains intermédiaires de fusion (cf Figure 2.15), grâce à leur courbure intrinsèque.



(a) **Le *stalk***. La courbure imposée à la monocouche externe dans un intermédiaire de type *stalk* est négative. Il est donc plus favorable pour des lipides coniques d'adopter ce type de configuration. L'hémifusion doit donc être promue si la quantité de lipides à petite tête ou à grosse ou nombreuses chaînes augmente sur le feuillet externe. Il faut noter que si la vésicule est très courbée dès le départ, ce type de lipides sera spontanément plutôt présent sur le feuillet interne et ne pourra pas promouvoir l'hémifusion aussi bien.



(b) **Le pore de fusion**. La courbure imposée à la monocouche interne lors de la formation d'un pore de fusion est positive. Les lipides à petite tête situés sur le feuillet interne inhibent donc l'ouverture d'un pore de fusion tandis que des lipides à grosse tête la favorisent. Comme dans le cas du *stalk*, plus la membrane est courbée, plus les lipides se sont réorganisés sur le feuillet le plus approprié afin de stabiliser la membrane, et moins leur effet est important.

FIGURE 2.15 – **Promotion ou inhibition de certains intermédiaires de fusion par la géométrie non cylindrique des lipides.**

De cette manière, certaines géométries de lipides peuvent promouvoir ou inhiber la fusion, en facilitant ou non certaines étapes de la fusion.

Pour autant, il est souvent très difficile de prévoir l'effet de l'ajout d'un lipide dans la membrane sur la fusion globale. En effet, un type de lipide est souvent situé sur les deux feuillets en même temps, et peut donc avoir des effets antagonistes lorsqu'il est placé sur l'un ou l'autre des feuillets. À titre d'exemple, un lipide à petite tête promouvra l'apparition du *stalk* s'il est situé sur le feuillet externe et inhibera l'ouverture du pore de fusion s'il l'est sur le feuillet interne. Si la cinétique d'une étape est limitante, c'est l'effet de ce lipide sur celle-ci qui dominera. Mais il se peut aussi que les deux étapes soient limitantes et que le lipide favorise l'hemifusion puis inhibe complètement la fusion. À l'inverse, un lipide peut permettre l'ouverture du pore de fusion, donc favoriser la fusion mais, sans hémifusion, la fusion ne pourra avoir lieu...

Il est, de ce fait, pratiquement impossible de prédire ce qu'il se passera sachant que la répartition exacte des lipides sur les feuillets n'est pas connue et que les niveaux énergétiques des différents intermédiaires, à considérer même qu'ils existent tels qu'ils sont décrits

dans la littérature, ne sont pas connus.

De plus, les lipides diffèrent par leur géométrie mais aussi par leur degré d'insaturation, et donc leur flexibilité.

À titre d'exemple, les lipides polyinsaturés sont à la fois plus solubles et enclins à adopter une conformation étendue [53]. Leur présence peut donc favoriser la nucléation de la fusion par extension d'une ou plusieurs queues à l'extérieur de la bicouche. Plus tard sur le chemin de la fusion, ils s'accommodent mieux de structures très courbées puisqu'ils peuvent adapter leur conformation pour être en adéquation avec celle de la membrane [67]. Ils facilitent donc éventuellement la formation de certains intermédiaires de fusion.

3 .1.2 Température

La température peut également avoir de nombreux effets sur la fusion.

Une hausse de la température augmente les fluctuations de la membrane et donc l'intensité de la répulsion d'ondulation [53], ce qui n'est pas favorable à l'initiation de la fusion.

Cependant, en déstabilisant la membrane par l'agitation thermique, une augmentation de la température favorise la formation de pores [53]. De plus, elle favorise le désordre et accroît donc la probabilité des lipides à adopter une conformation étendue [53], conformation qui est censée être primordiale pour l'initiation de la fusion. Le volume effectif des queues hydrophobes des lipides augmente également avec la température [53], ce qui revient à rendre le lipide plus conique, et à potentiellement promouvoir la formation de structures de type *stalk*. Enfin, la fluidité de la membrane augmente avec la température, ce qui peut favoriser un réarrangement moléculaire nécessaire à la fusion.

Les effets de la température sont donc nombreux. Étant donné que la température est un paramètre que nous faisons varier dans notre étude, nous présenterons, dans l'Annexe C, les arguments qui nous mènent à penser que les effets d'un changement de température resteront limités dans notre cas.

3 .1.3 Niveau d'hydratation

Dans des conditions d'hydratation très basse, le groupe de Huang a observé une nouvelle phase lipidique où des *stalks* étaient formés spontanément et restaient stables [47]. L'énergie du *stalk* par rapport à la phase lamellaire est donc, dans ces circonstances, négative, ce qui n'est pas toujours le cas et montre que le niveau d'hydratation a, lui aussi, un effet sur la stabilité des bicouches lipidiques et leur capacité à fusionner.

La température, la composition lipidique et le niveau d'hydratation font donc partie de la multitude de paramètres pouvant influencer la fusion.

De très nombreuses prédictions théoriques ont été faites au sujet des énergies de la fusion. Les paramètres choisis varient beaucoup, ce qui rend particulièrement difficile de les comparer systématiquement entre elles. Nous nous contenterons donc, dans la suite de

ce chapitre, d'en recenser quelques-unes et remarquerons tout de même que les différentes estimations convergent vers un même ordre de grandeur.

3 .2 Estimations énergétiques diverses

Les premières estimations de l'énergie du *stalk*, de l'ordre de $40\,k_BT$, découlaient de calculs théoriques de l'énergie de courbure de cette structure.

En 1993, Siegel introduit une composante supplémentaire à l'énergie du système découlant de l'existence de sortes de « vides » au sein de son cœur hydrophobe [21], du fait du décollement d'un des feuillets lipidiques de la bicouche pour former le *stalk*. L'énergie d'activation de la formation du *stalk* est alors estimée à environ $170\,k_BT$ pour des membranes de DOPC, ce qui soulève des questions sur la pertinence du modèle. En effet, cela représente une énergie considérable et, si c'était le cas, la fusion ne se ferait jamais spontanément. Pourtant, cette fusion spontanée existe, même si elle est très faible. De plus, la fusion demandant trop d'énergie, elle nécessiterait trop de protéines qui devraient agir de concert et focaliser beaucoup d'énergie sur un point de l'espace à un instant donné.

De nombreuses équipes se penchent alors sur la question et se focalisent sur l'énergie du *stalk* lui-même, puisque c'est le premier intermédiaire à intervenir sur le chemin de la fusion et que, sans son existence, toute poursuite de la fusion est jugée impossible. Chacune apporte des modifications sur la structure même du *stalk* ou bien sur la façon de calculer son énergie.

En 2001, Kuzmin *et al.* partent de l'idée de Leikin que le *stalk* puisse être créé entre deux protubérances, et estime alors l'énergie de la formation du *stalk* à $37\,k_BT$, en ajoutant un degré de liberté supplémentaire aux lipides - l'inclinaison - qui permet de combler les interstices hydrophobes mis en évidence par Siegel [22]. Il montre également qu'un apport supplémentaire de $40\,k_BT$ permet au *stalk* de se transformer en pré-pore, qui se transformera alors spontanément en pore de fusion, sans passer par la formation d'un diaphragme d'hémifusion, dont l'énergie libre est d'environ $150\,k_BT$ pour une tension de ligne valant $10\,k_BT/nm$.

Kozlovsky et Kozlov pointent alors du doigt le fait que, si l'on prend en compte la nécessité de courber les membranes en premier lieu, l'énergie requise pour former le *stalk* de Kuzmin vaut en fait plutôt $220\,k_BT$ [24]. Ils autorisent l'inclinaison des lipides, mais aussi la fluctuation des lipides selon la normale à la bicouche indépendamment les uns des autres, paramètres qui permettent la formation de structures très courbées [6] et la disparition des interstices hydrophobes. L'énergie d'activation de la formation du *stalk* est alors estimée à $45\,k_BT$ pour le DOPC et à $-30\,k_BT$ pour le DOPE. Kozlovsky *et al.* montrent plus tard qu'un diaphragme d'hémifusion s'agrandit spontanément pour des membranes présentant des lipides de géométrie suffisamment négatives (type DOPE) tandis que l'énergie du diaphragme est d'environ $150\,k_BT$ pour des diaphragmes de 5 nanomètres de diamètre formées dans une membrane de DOPC [25].

6. La possibilité de former des structures très courbées, avec des angles, est proposée à peu près au même moment par May *et al.* [26].

De leur côté, Markin et Albanesi proposent de revoir la géométrie même du *stalk* pour annuler sa courbure totale [23], et diminuer ainsi son énergie. De plus, ils proposent de résoudre le problème des interstices hydrophobes par l'hypothèse que des impuretés puissent potentiellement les remplir, ce qui n'a pas fait l'unanimité [26]. Dans ces conditions, l'énergie du *stalk* est alors de $13\,k_BT$ et celle de la finalisation de la fusion par ouverture d'un pore de $46\,k_BT$, pour un lipide quasiment cylindrique (type DOPC).

Peu à peu, les calculs théoriques laissent la place aux simulations numériques.

Grâce à des simulations fondées sur des algorithmes de Monte-Carlo, Katsov *et al.* calculent les énergies du *stalk* et d'expansion de celui-ci dans le cas de membranes plates et sans tension. Ils montrent que ces énergies dépendent très fortement de la courbure intrinsèque des lipides formant la membrane. Les lipides sont modélisés comme des copolymères diblocs comprenant deux monomères - un hydrophile et l'autre hydrophobe. Si les lipides ne sont pas assez courbés négativement (rapport entre les volumes des deux monomères), le *stalk* ne se forme pas. S'ils le sont trop, à l'inverse, le *stalk* se forme mais est tellement stable que la fusion n'est pas possible. Dans la faible zone où le *stalk* peut se former et donner naissance à un pore de fusion, ils estiment que l'énergie de formation du *stalk* ne dépend pas de la composition lipidique et vaut seulement environ $10\,k_BT$, ce qui est plus proche des estimations de Markin et Albanesi que de Kozlovsky et Kozlov. L'énergie associée à l'expansion de ce dernier est, en revanche, dépendante de la composition lipidique et est estimée entre 25 et $63\,k_BT$ pour des lipides présentant respectivement des courbures négatives (type DOPE) et cylindriques (type DOPC). La nucléation du pore de fusion est censée suivre de façon spontanée [59].

Tolpekina *et al.* se sont aussi penchés sur l'étape finale de la fusion et ont montré que la nucléation d'un pore dans une bicouche d'amphiphiles nécessitait entre 15 et $20\,k_BT$ [68], à l'aide de simulations gros grains. Cette énergie est cependant peut-être amoindrie dans le cas où la bicouche est un diaphragme d'hémifusion, puisque ses bords facilitent la création de trous [25]. Si l'on considère que l'énergie de finalisation de fusion par ouverture du pore de Markin et Albanesi correspond en majeure partie à l'énergie d'expansion du *stalk* et, qu'une fois ce dernier étendu, la nucléation de pore se fait spontanément, les résultats de Markin, Katsov et Tolpekina semblent être globalement en accord. En revanche, ils sont bien en dessous des estimations énergétiques de Kuzmin et Kozlovsky en ce qui concerne le diaphragme d'hémifusion.

Une autre étude de dynamique moléculaire gros grains [30] retrouve des valeurs comparables pour l'energie d'activation de la formation du *stalk*, même s'il elle ne considère pas du tout la même source pour cette énergie. En effet, la barrière énergétique à dépasser pour créer le *stalk* serait de l'ordre de $20\,k_BT$, du fait du niveau énergétique de l'état transitoire nécessaire à la fusion, impliquant l'existence d'un ou plusieurs lipides en conformation étendue. Elle ne résulterait pas du niveau énergétique du *stalk*, lui-même seulement séparé de l'état initial de $3\,k_BT$ pour des membranes plates de POPC faiblement hydratées et sans tension.

Une autre simulation gros grains estime à $34\,k_BT$ la différence d'énergie existant entre la situation initiale où les vésicules (50% de DOPC et 50% de DOPE) sont séparées et la situation finale où le *stalk* est formé. Celle entre le *stalk* et le pore de fusion s'élève à $52\,k_BT$ [31]. Ces estimations sont bien plus hautes que celles qui ont été présentées auparavant, mais la composition lipidique et la géométrie ne sont pas les mêmes.

La majorité des simulations trouvent finalement des énergies très basses pour la formation du *stalk* mais ne prennent pas en compte l'énergie nécessaire à la déshydratation des membranes. Aeffner *et al.* montrent, en effet, que le *stalk* devient favorable à peu près pour n'importe quelle composition si les membranes sont séparées d'environ un nanomètre [69]. Arriver à cette distance inter-membranaire est plus ou moins difficile selon la composition lipidique.

La variabilité des estimations énergétiques provient entre autres de la complexité du système. Les énergies dépendent en particulier de la composition lipidique, de la géométrie et du niveau d'hydratation de celui-ci.

Par conséquent, il est très difficile de comparer entre eux les résultats de différentes études théoriques, qui n'ont pas toujours les mêmes paramètres.

De plus, il est encore plus compliqué de comparer ces résultats à d'éventuels résultats expérimentaux, qui correspondent généralement à l'énergie d'activation effective de la fusion de bicouches lipidiques, soit de l'ensemble du processus de fusion, et non à celles des différentes étapes de la fusion.

3 .3 Nécessité de l'approche expérimentale

Nous espérons avoir montré que la fusion membranaire est un processus très complexe et que, même si des modèles ont été développés par la communauté scientifique, il reste très difficile de prévoir quel chemin sera emprunté par la fusion dans un cas ou un autre, et de prévoir les énergies mises en jeu. Il existe peut-être une infinité de modes de fusion, faisant chacun passer les membranes par des intermédiaires différents, et présentant des paysages énergétiques variables.

Trouver expérimentalement une estimation de l'énergie d'activation effective de la fusion dans son ensemble semble plus raisonnable.

Il est évident que les résultats obtenus seront moins précis, et que la majorité des détails seront omis, et il ne sera pas possible de trouver les énergies d'activations de chacune des sous-étapes mais cela permettra peut-être de tirer des conclusions sur le processus de fusion dans sa globalité.

Plusieurs équipes ont d'ailleurs jugé nécessaire d'adopter une telle approche [70, 71, 72]. Néanmoins, à notre connaissance, aucune mesure expérimentale de l'énergie globale de la fusion n'a été faite sans le déclenchement de la fusion par l'intermédiaire de l'action de protéines ou sans forcer les membranes l'une contre l'autre (avec du PEG, par exemple).

Nous pensons pourtant que les aspects énergétiques de la fusion ne peuvent pas être

facilement examinés lorsque la fusion est le résultat d'une contrainte externe, qui fournit de l'énergie au système, dont nous ne connaissons pas la valeur.

Cette étude a donc pour but de mesurer expérimentalement l'énergie d'activation effective de la fusion de bicouches lipidiques, en étudiant la fusion spontanée de vésicules. Le principe de l'étude est présenté dans le Chapitre 3.

Chapitre 3

Principe de l'étude

Le but de notre étude est de mesurer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de vésicules lipidiques. Brièvement, le principe est de corréler les vitesses de fusion non spécifique - résultant des rares collisions efficaces provenant de l'agitation thermique - avec les températures correspondantes. D'après le loi d'Arrhenius (cf Équation 3.5), la vitesse de fusion spontanée est censée augmenter de façon exponentielle avec la température, en faisant intervenir l'énergie d'activation.

Il faut donc parvenir à mettre en évidence la fusion - s'il y en a, et à étudier sa cinétique à différentes températures.

Lorsque les membranes étudiées sont celles de compartiments de petite taille (inférieure à $1\,\mu m$), comme c'est le cas dans cette étude, une observation directe par microscopie optique n'est pas possible, du fait de la limite de diffraction. La microscopie électronique rend possible, quant à elle, l'observation directe des structures mises en jeu mais ne permet pas d'étudier la cinétique des processus, étant donné que les images sont réalisées sur des échantillons fixés.

L'étude cinétique de la fusion membranaire ne peut donc généralement pas se faire par observation directe du processus et repose donc, la plupart du temps, sur des techniques de fluorescence.

Nous présenterons donc, dans un premier temps, plusieurs techniques - fondées ou non sur la fluorescence - permettant la détection de la fusion de bicouches lipidiques, et éventuellement l'étude de sa cinétique.

Ensuite, nous reviendrons plus précisément sur le principe de notre étude, en particulier sur la façon dont l'énergie d'activation peut être déduite des taux de fusion non spécifique correspondant à chaque température.

1 Mise en évidence expérimentale de la fusion membranaire

La fusion membranaire consiste en la coalescence de deux membranes. En général, ces membranes délimitent deux compartiments et la fusion de ces dernières entraîne la formation d'un pore de fusion. Elle s'accompagne donc d'un mélange des lipides des membranes

impliquées, ainsi que de la réunion des contenus des compartiments ayant fusionné.

Mettre en évidence un mélange des lipides ou un partage des contenus permet donc d'étudier la fusion membranaire.

Une sonde fluorescente est une molécule qui rayonne à une longueur d'onde particulière lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde appartenant à son spectre d'excitation [1] (cf Figure 3.1). L'utilisation de sondes fluorescentes, très courante en biologie et en biophysique, permet de marquer certains composants ou molécules d'une cellule ou d'un système biomimétique, et de suivre leur évolution spatio-temporelle.

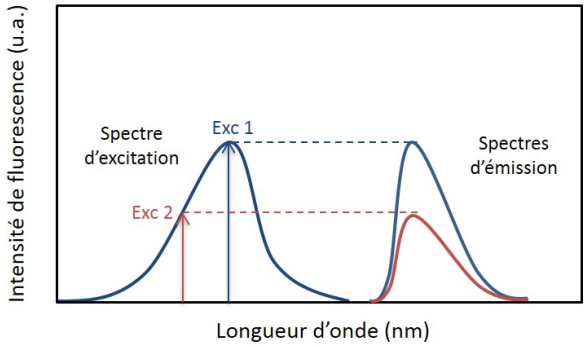


FIGURE 3.1 – **Principe de la fluorescence**. Une molécule fluorescente émet de la lumière à une longueur d'onde particulière si elle est excitée à une longueur d'onde faisant partie de son spectre d'excitation. Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, son spectre d'émission sera centré sur la même longueur d'onde mais l'intensité pourra varier.

Le FRET (acronyme de l'anglais *Förster Resonance Energy Transfer*) et l'auto-extinction de fluorescence sont deux processus fondés sur des transferts d'énergie entre molécules fluorescentes. On y a souvent recours pour mettre en évidence la fusion membranaire. Dans un premier temps, nous les présenterons donc, l'un et l'autre.

La majeure partie de ce travail étant fondée sur l'étude de la cinétique de fusion grâce au FRET, nous détaillerons ensuite la façon dont celui-ci permet de détecter le mélange des lipides accompagnant la fusion membranaire.

Enfin, nous reviendrons sur la limite principale de l'étude de la fusion membranaire par détection du partage de lipides, et décrirons certaines approches complémentaires qui sont habituellement associées à ce type d'étude.

1 .1 FRET et auto-extinction de fluorescence

1 .1.1 Le FRET

Le FRET est un processus de transfert non radiatif d'énergie (sans émission de lumière) entre deux molécules fluorescentes constituant un couple donneur/accepteur [73] (cf Figure 3.2).

1. La molécule peut être excitée à une longueur d'onde différente de sa longueur d'onde d'excitation, mais son émission est amoindrie. L'ensemble de ces longueurs d'onde constitue son spectre d'excitation. De même, son émission n'est pas monochromatique.

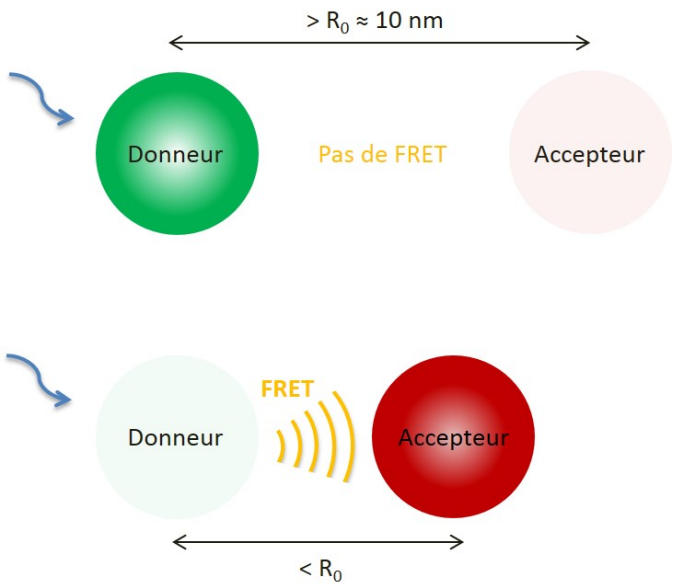


FIGURE 3.2 – **Principe du FRET**. Le FRET est un processus de transfert non radiatif d'énergie entre deux fluorophores, un donneur et un accepteur. Si le donneur est excité et qu'il est suffisamment proche de l'accepteur, le donneur cède une partie de son énergie à l'accepteur, qui émet comme s'il avait été excité directement.

Pour que ce transfert ait lieu, les deux molécules fluorescentes doivent remplir plusieurs conditions. Tout d'abord, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'excitation de l'accepteur. De plus, les deux fluorophores doivent être suffisamment proches l'un de l'autre (cf Figure 3.2) - à une distance inférieure au rayon de Förster R_0 du couple, défini dans l'Équation 3.1.

Alors, en cas d'excitation du donneur, celui-ci verra son émission diminuer au profit de celle de l'accepteur, qui va pouvoir émettre comme s'il avait été excité directement (cf Figure 3.2). Comme tout processus, ce transfert s'accompagne d'une perte d'énergie non nulle, en particulier, sous forme de vibrations.

Une des propriétés fondamentales du FRET est qu'autour de R_0, l'efficacité de transfert décroit extrêmement vite avec la distance R séparant les deux fluorophores (cf Équation 3.2 et Figure 3.3). Dans cette gamme, le FRET est donc très sensible à de faibles changements de distance entre les sondes fluorescentes et permet ainsi de mettre en évidence des interactions moléculaires [74].

$$R_0 = (J\ K^2\ Q_0\ n^{-4})^{1/6} \times 9,79\ 10^3 \tag{3.1}$$

où R_0, le rayon de Förster (exprimé en Å), est la distance donneur-accepteur à laquelle la probabilité que le donneur se désexcite par FRET est de 50 %, J est l'intégrale de recouvrement des spectres (en $cm^3\ M^{-1}$), K^2 le facteur d'orientation des dipôles [a], Q_0 le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur, et n l'indice de réfraction du milieu.

a. Le facteur d'orientation est pris égal à $\frac{2}{3}$ lorsque les donneurs et accepteurs sont orientés aléatoirement dans l'espace

$$E = \frac{1}{1 + (\frac{R}{R_0})^6} \tag{3.2}$$

où E est l'efficacité de transfert, R la distance séparant le donneur et l'accepteur et R_0 le rayon de Förster.

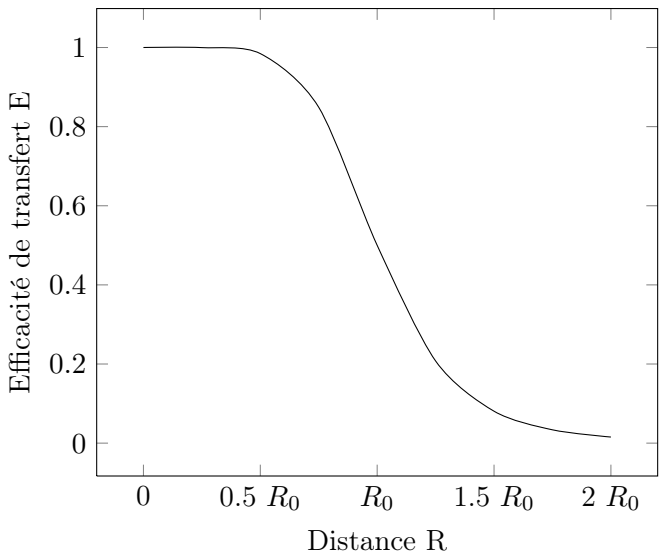


FIGURE 3.3 – **Efficacité du FRET en fonction de la distance donneur-accepteur**. L'efficacité du FRET décroît très vite autour de R_0, ce qui le rend très sensible à de changements de distance dans cette gamme de distances.

1 .1.2 L'auto-extinction de fluorescence

L'auto-extinction de fluorescence, ou *self-quenching* en anglais, est un processus très similaire au FRET. Cependant, il n'implique pas deux molécules de nature différente mais deux copies d'une même molécule.

Comme pour le FRET qui voit un donneur transférer une partie de son énergie à un accepteur dans certaines conditions, si une molécule fluorescente, dont les spectres d'excitation et d'émission se recouvrent, se trouve suffisamment proche d'une molécule du même type, elle pourra transférer une partie de son énergie à sa voisine ; et ce, avec une efficacité qui n'est pas de 100%.

Dans une solution diluée, les molécules sont trop éloignées pour que ce type de transfert d'énergie ait lieu. L'intensité de fluorescence d'un fluorophore augmente donc linéairement avec sa concentration, c'est-à-dire que plus il y a de fluorophores, plus l'intensité de fluorescence est grande.

Lorsque la concentration en fluorophores augmente, la fluorescence quitte le régime linéaire - la croissance devenant moindre - puis celle-ci sature et décroît. En effet, au lieu qu'une molécule excitée réémette directement de la lumière, des transferts d'énergie ont lieu entre les molécules et la perte d'énergie accompagnant chacun de ces transferts est à l'origine de la décroissance de l'intensité de fluorescence à haute concentration.

L'intensité de fluorescence d'une molécule est donc amoindrie par la proximité avec

d'autres molécules du même type et c'est pourquoi on parle d'« auto-extinction de fluorescence ».

Le FRET et l'auto-extinction de fluorescence sont deux processus dépendant très fortement de l'écartement des sondes fluorescentes et permettent donc d'avoir une idée de la distance moyenne séparant les fluorophores. Si l'efficacité de transfert change avec le temps, ce dernier peut éventuellement permettre de mettre en évidence des mouvements de molécules les unes par rapport aux autres. Ils peuvent en général être utilisés de manière équivalente.

1 .2 Suivi du mélange de lipides par le FRET

Une bicouche lipidique peut être considérée, en première approximation, comme un fluide à deux dimensions : ce sont des liens non covalents, ayant pour origine les forces de van der Waals, qui assurent la cohésion des bicouches lipidiques. Lorsque le feuillet lipidique est maintenu à une température supérieure à sa température de transition de phase, les lipides diffusent donc librement sur l'intégralité de la bicouche [2]. Après une seconde, la distance qui les écarte de leur point de départ est de l'ordre du micromètre.

En cas de fusion entre deux bicouches lipidiques, les lipides initialement présents dans une des bicouches pourront diffuser sur la nouvelle surface qui leur est offerte et les lipides des deux bicouches finiront par être totalement mélangés (cf Figure 3.4).

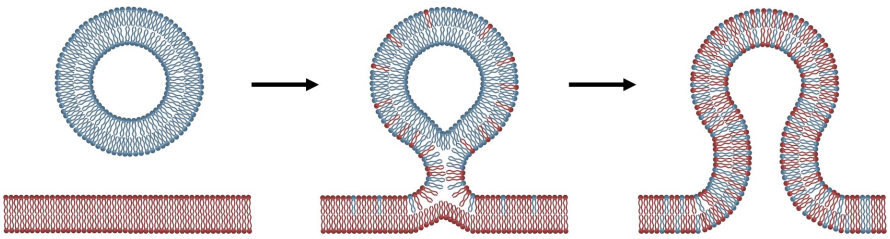


FIGURE 3.4 – **Diffusion de lipides lors de la fusion de deux bicouches lipidiques**. Un événement de fusion est accompagné d'un partage de lipides entre les bicouches concernées, du fait du caractère fluide de ces dernières. *Figure extraite de [75].*

Détecter un partage de lipides permet donc de mettre en évidence la fusion membranaire sans directement l'observer, et c'est cette approche que nous avons adoptée dans cette étude.

Pour détecter le mélange des lipides accompagnant la fusion, on peut avoir recours à une technique de fluorescence. Si certains lipides sont marqués avec des sondes fluorescentes de type donneur, et d'autres avec des sondes de type accepteur, il est possible de suivre leur rapprochement ou leur éloignement les uns par rapport aux autres grâce à l'étude de la variation de l'efficacité du FRET.

2. Nous avons vu dans le Chapitre 1 que ce n'était pas forcément toujours le cas. En effet, les membranes peuvent présenter des domaines de fluidités différentes, et les échanges entre ces domaines peuvent être limités.

Ainsi, le principe consiste à observer la fusion d'une membrane contenant des lipides fluorescents de deux types (donneur et accepteur, en concentration suffisante pour que le FRET soit possible) avec une membrane non fluorescente [76]. Si les deux membranes fusionnent, les fluorophores présents sur la première membrane vont pouvoir diffuser sur la surface qui leur est maintenant accessible (cf Figure 3.4) et les sondes fluorescentes vont être globalement diluées. L'efficacité du FRET sera donc amoindrie par l'écartement des sondes. Si on excite le donneur et suit son intensité de fluorescence, celle-ci va augmenter puisque le donneur perdra moins d'énergie au profit de l'accepteur, le FRET diminuant (cf Figure 3.5).

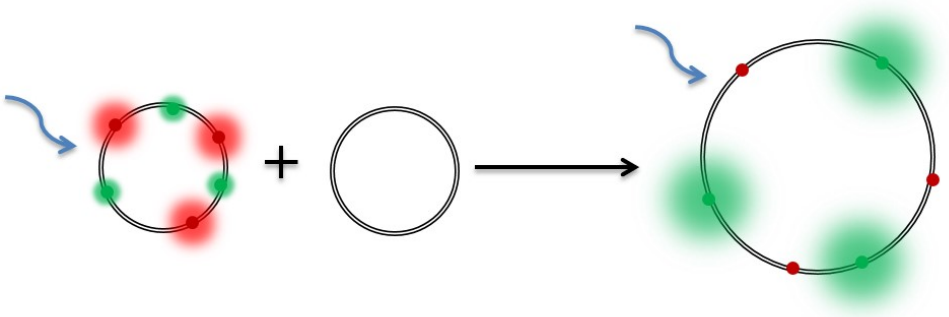


FIGURE 3.5 – **Mise en évidence du partage de lipides grâce au FRET**. Si une bicouche contenant le couple donneur (vert) / accepteur (rouge) à haute concentration fusionne avec une bicouche non marquée, les fluorophores vont être dilués et leur concentration va diminuer. Si le donneur est excité, son intensité de fluorescence augmente puisque l'efficacité de transfert du FRET est amoindrie. Une augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur permet ainsi de mettre en évidence la fusion, ou du moins le partage de lipides entre deux bicouches.

1 .3 Distinction entre fusion et autres types de partage de lipides

Le partage de lipides peut servir à mettre en évidence la fusion de bicouches lipidiques puisqu'un événement de fusion est forcément accompagné d'un mélange de lipides. La réciproque est, en revanche, fausse.

En cas d'hémifusion, seules les monocouches externes fusionnent. Un mélange de lipides peut donc être détecté puisque les lipides du feuillet externe sont partagés, mais la fusion est pourtant incomplète. Le partage de lipides ne permet donc pas de distinguer les processus d'hémifusion et de fusion.

De même, un transfert de lipides d'un autre type peut théoriquement avoir lieu entre deux bicouches, et ne pourrait pas, de cette façon, être distingué d'un événement de fusion.

Étudier le mélange de contenu permet, quant à lui, de se focaliser uniquement sur les événements de vraie fusion. En effet, pour qu'il y ait partage des contenus aqueux des compartiments, il faut qu'il y ait ouverture d'un pore de fusion et donc fusion totale.

Cependant, il faut préciser qu'étudier le mélange de contenus présente aussi ses inconvénients. La cinétique du mélange de contenu dépend des tailles respectives du soluté étudié, du pore et de la vésicule (cf Équation 3.3) [77].

$$\tau = \frac{4\,R^2}{\theta_0\,(r_p - r_s)^2} \tag{3.3}$$

où τ est le temps caractéristique de relargage du soluté, R le rayon de la vésicule, θ_0 la fréquence de collision du soluté avec la membrane de la vésicule, r_p le rayon du pore de fusion et r_s le rayon hydrodynamique du soluté.

Ainsi, si le pore de fusion est très petit ou si son existence est trop brève, on pourrait imaginer ne pas être capable de détecter la fusion par l'étude du mélange de contenu. Dans une moindre mesure, si on parvient tout de même à mettre en évidence la fusion par cette méthode, il se peut que l'étude de sa cinétique soit biaisée par la cinétique de relargage du contenu.

Le partage de lipides, quant à lui, du fait de la vitesse de diffusion des lipides sur la bicouche lipidique, peut s'avérer plus efficace dans certains cas. Du point de vue de la cinétique, l'étude de la fusion grâce au mélange de lipides reste donc très utile.

Néanmoins, dans le cas de l'étude d'un processus de fusion par suivi du mélange des lipides, la vérification, *a posteriori*, que l'événement étudié correspond bel et bien à de la fusion complète est évidemment nécessaire. Nous reviendrons donc sur différentes techniques permettant de distinguer fusion et hémifusion, même si toutes ne permettent pas de mener une étude cinétique du processus.

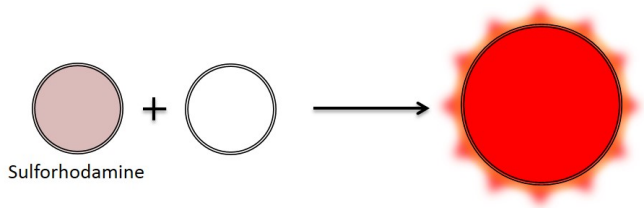
1 .3.1 Techniques de fluorescence

Mélange du contenu

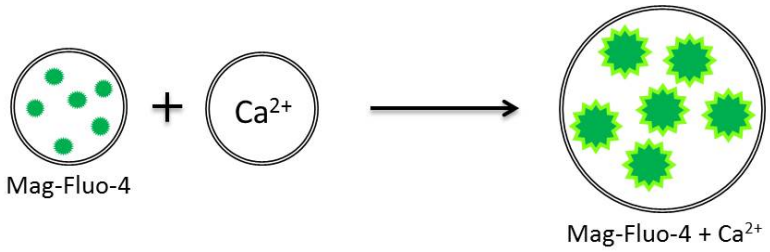
En cas de fusion de deux compartiments, on peut considérer que le contenu de l'un d'entre eux est dilué dans le deuxième ou que les deux contenus sont regroupés. Ceci peut, dans certains cas, être mis en évidence grâce à des techniques de fluorescence (cf Figure 3.6).

Si une molécule telle que la sulforhodamine, connue pour ses propriétés d'auto-extinction de fluorescence, est encapsulée à haute concentration dans une vésicule qui fusionne avec un compartiment ne contenant pas de fluorophore, la dilution de cette molécule va entraîner une augmentation son intensité de la fluorescence [78] (cf Figure 3.6a).

De la même façon, si deux vésicules renfermant chacune un membre d'un couple réactif fusionnent, une réaction chimique peut avoir lieu et se traduire, dans certains cas, par un changement de fluorescence. À titre d'exemple, le Mag-Fluo-4 devient fluorescent en présence d'ions Ca^{2+} [77] (cf Figure 3.6b) et l'ANTS (8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid disodium) perd sa fluorescence en présence de DPX (p-Xylene-bis(N-pyridinium bromide)) [79].



(a) **Dilution d'une molécule capable d'auto-extinction de fluorescence**. L'intensité de fluorescence de la sulforhodamine décroît à haute concentration. En partant d'une vésicule remplie d'une solution concentrée de sulforhodamine, on obtient un recouvrement de fluorescence lors de la dilution accompagnant la fusion de celle-ci avec une autre vésicule.



(b) **Regroupement de deux espèces**. En présence de calcium, l'intensité de fluorescence émise par le Mag-Fluo-4 augmente. L'augmentation de fluorescence accompagnant le regroupement de ces deux espèces met en évidence la fusion.

FIGURE 3.6 – **Mise en évidence du mélange de contenu**.

Ces techniques ont l'avantage de permettre la distinction entre fusion et hémifusion mais elles présentent tout de même plusieurs inconvénients.

Le premier est le risque d'erreur sur l'étude de la cinétique de fusion, du fait de la cinétique de relargage du contenu, que nous avons déjà évoqué. L'autre problème principal est que les bicouches lipidiques ne sont pas des cloisons parfaites et qu'il est courant d'avoir des fuites de contenu sans événement de fusion. De plus, ces fuites dépendent très probablement de la température, ce qui ne facilite pas la comparaison de processus à différentes températures, ce qui est pourtant nécessaire dans notre étude.

Mélange de lipides des feuillets internes

La fusion complète peut aussi bien être mise en évidence par le mélange de contenu que par la détection du partage des lipides provenant du feuillet interne. En effet, les lipides du feuillet interne ne sont partagés que lors de la finalisation de la fusion, au moment où les monocouches internes des membranes fusionnent. Distinguer la fusion des différents feuillets de la membrane revient donc à distinguer fusion et hémifusion.

Le couple NBD-Rhodamine (donneur-accepteur) est très couramment utilisé pour l'étude de la fusion membranaire fondée sur le changement de FRET. Le dithionite de sodium (ou hydrosulfite de sodium) $Na_2S_2O_4$ est un agent réducteur qui détruit de façon irréversible la fluorescence du NBD (cf Figure 3.7) et n'a théoriquement pas la capacité de traverser les membranes [80].

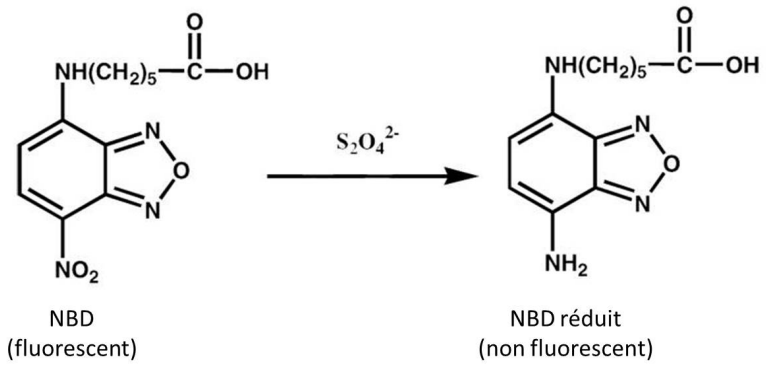


FIGURE 3.7 – **Réduction du NBD par le dithionite**. La forme réduite du NBD n'est pas fluorescente. *Figure adaptée à partir de [81].*

Une fois les vésicules fluorescentes formées, ajouter du dithionite à l'extérieur de ces vésicules permet de supprimer la fluorescence du NBD du feuillet externe.

Si ces vésicules sont amenées à fusionner avec des vésicules non fluorescentes, une augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur (ici NBD) est synonyme de fusion complète car il provient d'une dilution des lipides du feuillet interne puisqu'il ne reste plus de NBD sur la monocouche externe [82]. Ce prétraitement au dithionite permet donc de distinguer fusion et hémifusion.

Cette technique présente néanmoins, elle aussi, des inconvénients, à commencer par le fait que les membranes ne sont, en réalité, pas totalement imperméables au dithionite. De plus, l'éventuelle pénétration du dithionite dans les vésicules dépend de la température.

1 .3.2 Cryo-microscopie électronique

La microscopie optique ne permet pas l'observation directe de petites vésicules, du fait de la limite de diffraction. La microscopie électronique, quant à elle, en utilisant des électrons, ayant une longueur d'onde plus petite que celle des photons du spectre visible, permet de descendre en résolution et d'observer des liposomes de petite taille.

Si cette technique ne permet pas de mener une étude cinétique de la fusion puisque les échantillons sont fixés, elle permet d'observer directement les liposomes et les structures éventuellement formées par plusieurs liposomes ayant interagit.

Cette technique permet, tout d'abord, de mesurer directement les tailles des liposomes avant et après un test de fusion pour mettre en évidence une éventuelle évolution de celles-ci. Il faut néanmoins préciser que, pour avoir une nette évolution de leur distribution, il faut avoir une proportion de fusion assez importante. De plus, la distribution initiale des tailles des vésicules doit être très étroite. Enfin, il est impératif de réaliser de nombreux clichés pour avoir des statistiques raisonnables. La microscopie électronique permet également d'observer les structures et les formes des liposomes. Il est donc possible de mettre en évidence l'hémifusion par observation directe des objets puisque distinguer diaphragme d'hémifusion et apposition proche de membranes est faisable [83] (cf Figure 3.8).

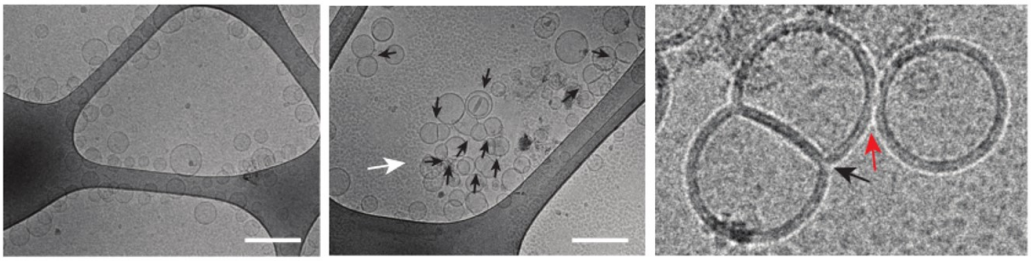


FIGURE 3.8 – **Distinction entre hémifusion et apposition de membranes**. Barre d'échelle : 200 nm. *Gauche* : Liposomes comprenant seulement les SNAREs d'autophagie. *Milieu* : Liposomes présentant des SNAREs et des protéines ATG14. *Droite* : Vue rapprochée distinguant hémifusion (flèche noire) et apposition proche des membranes (flèche rouge). *Figure extraite de [83].*

Que ce soit par des techniques de fluorescence ou par microscopie électronique, il existe donc des moyens de vérifier si les résultats obtenus grâce à la détection d'un mélange de lipides correspondent globalement à des événements de fusion ou d'hémifusion.

Si un processus d'hémifusion est étudié, il n'y aura ni signal pour le mélange de contenu, ni pour le partage des lipides du feuillet interne, et des diaphragmes d'hémifusion pourront théoriquement être observés dans l'échantillon en fin d'expérience.

En revanche, si on a uniquement à faire à de la fusion, les conclusions seront plus difficiles à tirer. On pourra voir un signal pour le mélange du contenu et des lipides des moncouches internes mais écarter la possibilité d'avoir en même temps des événements d'hémifusion est très complexe. En effet, montrer que quelque chose n'existe pas est impossible. Si aucun diaphragme d'hémifusion n'est observé, on ne pourra pas dire qu'il n'y a jamais d'événement d'hémifusion, mais on pourra tout au plus montrer qu'ils constituent des événements rares par rapport à ceux de fusion complète.

2 Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion

In vivo, la fusion ne doit pas avoir lieu spontanément, de manière à ce que l'intégrité des compartiments soit préservée et que la fusion puisse potentiellement être régulée. Une barrière énergétique doit donc être franchie pour que, de deux structures distinctes on passe à une seule structure continue. Un apport d'énergie est nécessaire et ce sont en général les protéines qui s'en chargent.

Pour mesurer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de bicouches lipidiques, nous avons choisi d'étudier la fusion non spécifique de vésicules lipidiques, ou fusion spontanée. Cette fusion résulte uniquement des collisions des vésicules entre elles - dues à l'agitation thermique - et non de l'action de protéines [3]. Elle dépend donc de la température.

D'après la loi d'Arrhenius (cf Équation 3.5), la cinétique de cette fusion augmente ex-

3. Cette fusion spontanée existe et augmente avec la température mais elle reste globalement toujours assez faible et c'est pour cela que nous avons commencé par dire que la fusion n'avait généralement pas lieu spontanément.

ponentiellement avec la température, en faisant intervenir l'énergie d'activation. L'énergie d'activation (E_{A}) peut donc être déduite de la corrélation de chaque vitesse de fusion avec la température correspondante.

2 .1 Mouvement brownien et loi d'Arrhenius

Dès que la température dépasse le zéro absolu, tout colloïde (particule de taille allant du nanomètre au micromètre) immergé dans un fluide est animé d'un mouvement aléatoire appelé « mouvement brownien ». Ce mouvement résulte des multiples collisions que subit le colloïde à chaque instant par des particules de fluide. La résultante de ces chocs variant sans cesse, cela entraîne un mouvement semblable à une marche au hasard car, à cette échelle, les effets de gravité sont négligeables.

Si plusieurs colloïdes sont immergés dans une même solution, étant tous en mouvement, ils peuvent également s'entrechoquer.

Dans le cas de réactions chimiques, les molécules, qui sont des colloïdes, entrent régulièrement en contact. Ces contacts sont nécessaires mais ne sont pas forcément suffisants pour que la réaction chimique puisse avoir lieu. En effet, il faut souvent que les collisions remplissent plusieurs conditions supplémentaires pour qu'elles soient efficaces.

Dans ces cas, il faut tout d'abord que les molécules entrent en contact avec une orientation particulière (permettant aux liaisons chimiques impliquées dans la réaction d'être suffisamment proches, par exemple). De plus, les molécules doivent parfois posséder une énergie cinétique suffisante. En effet, la réaction ne peut pas forcément avoir lieu si les deux molécules ne possèdent pas assez d'énergie pour passer par un état transitoire dont le niveau énergétique est plus élevé que celui de l'état initial (cf Figure 3.9). L'énergie libérée lors d'un choc étant directement reliée à l'énergie cinétique des particules entrant en collision, la réaction ne peut avoir lieu que si les énergies cinétiques des réactifs sont suffisamment élevées. L'énergie libérée peut ainsi dépasser E_{A}, et permettre de casser des liaisons et d'en reconstituer pour former le ou les produits.

D'après la théorie cinétique des gaz, la quantité de molécules animées d'une vitesse v suit la distribution de Maxwell-Boltzmann (cf Figure 3.10), dont la forme est décrite par l'Équation 3.4. On considère que cette distribution décrit également bien ce qui se passe dans un liquide.

$$P(v) = 4\pi v^2 \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{\frac{3}{2}} e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}} \tag{3.4}$$

où $P(v)$ est la probabilité qu'une molécule soit animée de la vitesse v, m la masse de la particule, et $k_B T$ le produit de la constante de Boltzmann k_B avec la température T (en Kelvin), soit l'énergie thermique.

La proportion de particules possédant une vitesse supérieure à une valeur limite donnée, et donc une énergie supérieure à E_{A}, augmente avec la température (cf Figure 3.10). De ce fait, la proportion de collisions efficaces et donc la vitesse de réaction augmentent également

lorsque la température est accrue.

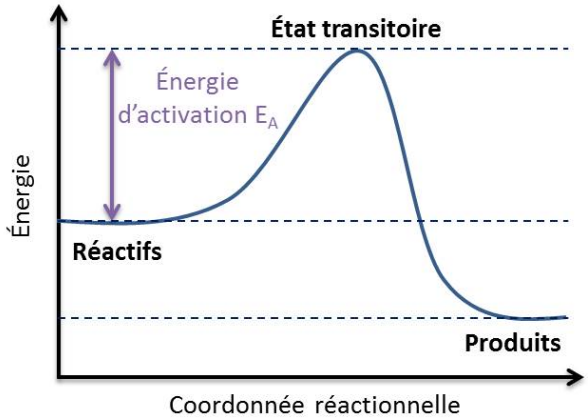


FIGURE 3.9 – **Diagramme énergétique d'une réaction chimique**. Les niveaux d'énergie des différents constituants sont représentés en fonction de la progression de la réaction. Si on fournit aux réactifs assez d'énergie (correspondant à l'énergie d'activation), ils peuvent passer par l'état transitoire pour donner naissance aux produits.

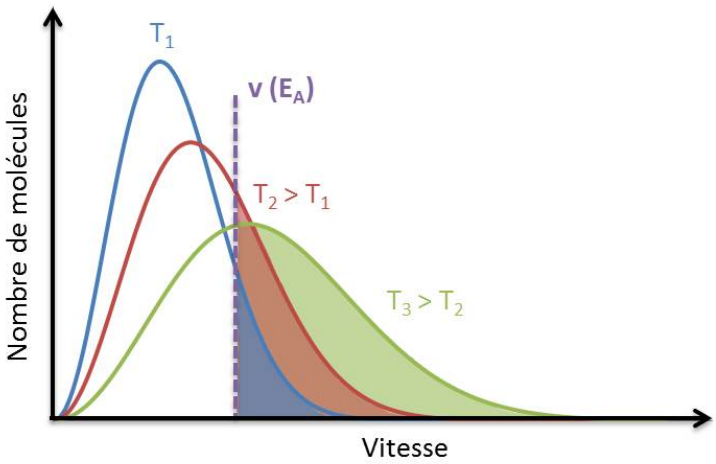


FIGURE 3.10 – **Distributions de Maxwell-Boltzmann à trois températures**. Le nombre de particules est représenté en fonction de leur vitesse v. La vitesse étant directement reliée à l'énergie cinétique, plus la température est élevée, plus la proportion de particules ayant une énergie cinétique supérieure à l'énergie d'activation (surfaces colorées sous les courbes) est grande, donc plus le nombre de collisions efficaces et la vitesse de réaction sont élevés.

La loi d'Arrhenius (cf Équation 3.5) est une loi empirique qui explicite à quelle allure la vitesse de réaction augmente avec la température. Elle fait donc intervenir E_A puisque la proportion de collisions efficaces en dépend directement. En effet, le simple qualificatif « efficace » signifie que l'énergie libérée lors de la collision est supérieure à E_A.

La vitesse de fusion dépend aussi d'autres paramètres tels que la concentration de réactifs, qui, en augmentant, accroît leur probabilité de rencontre. Le préfacteur d'Arrhenius A inclut les effets de tous ces paramètres.

$$v_R = A\ e^{-\frac{E_\mathrm{A}}{k_B T}} \tag{3.5}$$

où v_R est la vitesse de réaction, A un facteur pré-exponentiel ou préfacteur d'Arrhenius, E_A l'énergie d'activation, et $k_B T$ l'énergie thermique.

2 .2 Détermination de l'énergie d'activation

Considérons maintenant une solution de vésicules lipidiques. Ces vésicules sont aussi des colloïdes animés d'un mouvement brownien et entrent donc en collision. Tout comme pour certaines réactions chimiques, ces collisions sont nécessaires mais pas suffisantes pour que la fusion ait lieu. En effet, si des liaisons chimiques doivent être modifiées lors des réactions chimiques, ce sont ici les lipides eux-mêmes qui doivent être réarrangés pour que la fusion soit possible. Cela requiert également de passer une ou plusieurs barrières énergétiques (cf Figure 3.11) et toutes les collisions ne sont donc pas suffisamment énergétiques et efficaces pour entraîner la fusion.

Le coût énergétique de ces réarrangements lipidiques provient du fait que la perturbation des bicouches lipidiques, initialement dans un état stable, fasse passer le système par un ou plusieurs états transitoires très énergétiques, du fait de la perturbation de l'arrangement optimal et de l'éventuelle exposition au milieu aqueux de certaines parties hydrophobes des lipides (cf Figure 3.11).

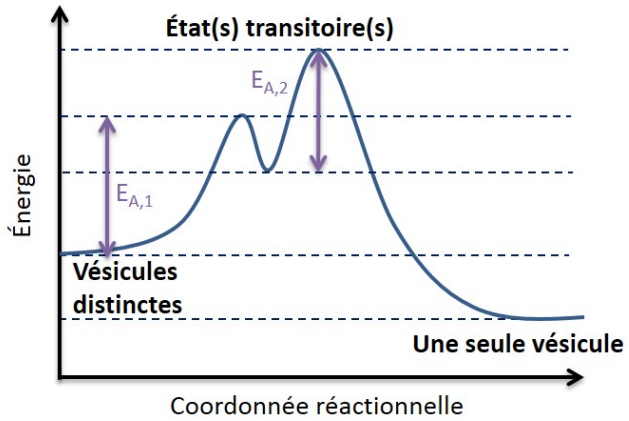


FIGURE 3.11 – **Équivalent du diagramme énergétique d'une réaction chimique pour le processus de fusion de vésicules**. Le paysage énergétique visité par les membranes lors de la fusion n'est pas connu et est sûrement particulièrement compliqué ; il est donc représenté de façon arbitraire. L'énergie d'activation résultante dépend de l'énergie d'activation maximale des différentes étapes ainsi que de la largeur totale de la courbe mais elle ne peut pas être déduite simplement à partir des différentes énergies d'activations.

À température physiologique, la majorité des chocs ne sont pas assez énergétiques pour que les vésicules fusionnent entre elles spontanément. C'est ce qui assure l'intégrité des organismes vivants, et explique la nécessité d'avoir des machineries protéiques pour

engendrer la fusion *in vivo*.

Néanmoins, certaines de ces collisions, correspondant à la queue de la courbe de Maxwell-Boltzmann, peuvent être assez énergétiques pour entraîner la fusion de deux vésicules. C'est à ces très rares collisions que nous nous intéressons. La proportion de ces collisions, dites efficaces, augmente donc, elle aussi, avec la température. Ainsi, de façon semblable aux réactions chimiques possédant une énergie d'activation, la cinétique de la fusion non spécifique des vésicules est déterminée par la loi d'Arrhenius [4] et reliée à la température par l'intermédiaire de l'énergie d'activation E_{A}.

Afin de déterminer la valeur de E_{A}, la vitesse de fusion spontanée est donc mesurée à différentes températures.

Pour cela, la fusion est mise en évidence grâce à la technique décrite en 1 .2 de ce chapitre. Deux populations de vésicules sont mélangées (cf Figure 3.12a) : l'une, en excès, dont les lipides ne sont pas fluorescents et l'autre, dont certains lipides sont marqués avec des sondes fluorescentes de type donneur ou accepteur. La fusion des deux types de vésicules est mise en évidence par l'augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur accompagnant la dilution des fluorophores découlant de la fusion (cf Figure 3.12a).

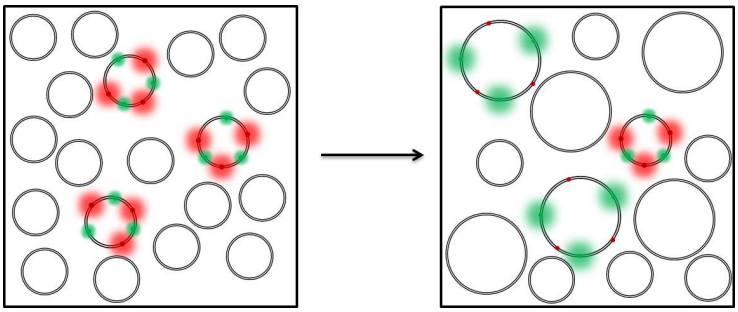
La pente initiale de la courbe représentant l'intensité de fluorescence du donneur en fonction du temps est reliée à la vitesse initiale de fusion (cf Figure 3.12b haut).

La vitesse de fusion augmentant de façon exponentielle avec la température (loi d'Arrhenius), la corrélation des différentes vitesses de fusion avec les températures correspondantes permet la détermination de E_{A} (cf Figure 3.12b bas).

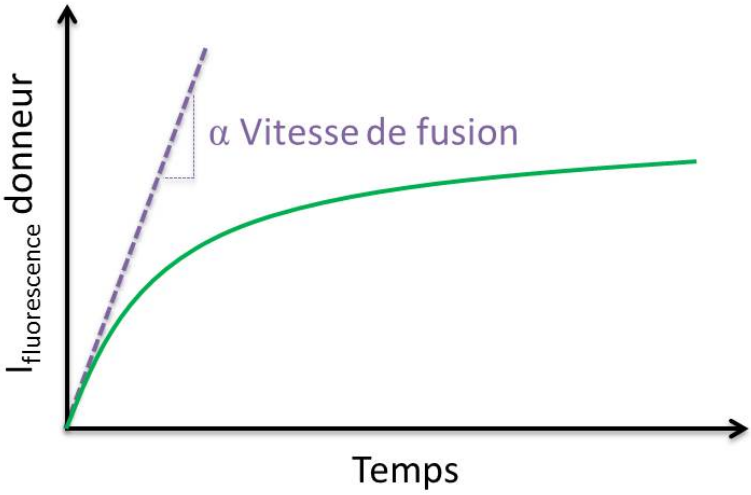
Le but principal de cette étude étant de mesurer les énergies d'activation de la fusion de vésicules lipidiques dans différentes conditions, une grande partie des expériences menées sont fondées sur ce type de mesure. Nous présenterons donc plus précisément le protocole dans le chapitre suivant.

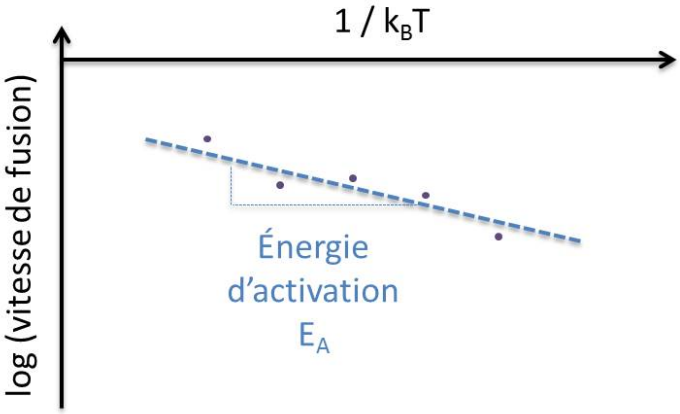
Nous nous pencherons également sur la façon dont les résultats sont analysés. En effet, nous n'obtenons pas directement la vitesse de fusion mais la vitesse d'augmentation de l'intensité de fluorescence pour chaque température. La fluorescence étant un phénomène dépendant de la température, des corrections doivent être apportés aux résultats bruts pour pouvoir comparer les vitesses de fusion entre elles, et déduire l'énergie d'activation.

4. Si la proportion de chocs efficaces est le facteur principal engendrant une augmentation de la vitesse de fusion avec la température, d'autres paramètres peuvent également l'influencer. Nous considérerons, néanmoins, que leur influence est marginale, et discuterons ce point dans l'Annexe C.



(a) **Détection de la fusion**. Deux populations de vésicules (fluorescentes et non fluorescentes) sont incubées ensemble à température contrôlée. La fusion des deux types de vésicules entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur, comme on l'a vu dans la section 1 .2.





(b) **Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion**. *Les données sont fictives.* La pente initiale de la courbe $I_{fluo,donneur} = f(t)$ est reliée à la vitesse initiale de fusion. Chaque température a une vitesse de fusion propre et donne donc une pente différente. D'après la loi d'Arrhenius, la vitesse de fusion augmente exponentiellement avec la température, en faisant intervenir E_A. En ajustant les données avec une exponentielle, on détermine E_A.

FIGURE 3.12 – **Détermination de l'énergie d'activation de la fusion**.

Chapitre 4

Quantification des vitesses de fusion

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le mélange de lipides entre deux vésicules, et donc la fusion, pouvait être mis en évidence grâce au FRET. Pour autant, notre étude nécessite non seulement de mettre en évidence qualitativement la fusion mais aussi de comparer sa vitesse à différentes températures pour déterminer son énergie d'activation.

La fluorescence étant un processus sensible à la température, il fallait donc, dans un premier temps, vérifier si les résultats obtenus à différentes températures étaient comparables entre eux.

Dans ce chapitre, nous présenterons, tout d'abord, le protocole expérimental permettant la détection du mélange de lipides, et la façon dont sont généralement traitées les données pour obtenir une estimation de la vitesse de fusion à une température donnée.

Nous pourrons alors nous pencher sur les raisons pour lesquelles de telles vitesses de fusion ne sont pas directement comparables lorsqu'elles sont mesurées à différentes températures, et sur la façon de les corriger pour qu'elles le deviennent.

1 Acquisition des données

La fusion de liposomes est suivie en travaillant avec deux populations de vésicules, les unes comprenant deux types de fluorophores - un donneur (NBD) et un accepteur (Rh) - et les autres n'étant pas fluorescentes. La dilution de la fluorescence engendrée par la fusion de vésicules de type différent entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence du NBD (cf Chapitre 3). La vitesse d'augmentation de la fluorescence du donneur est donc reliée à la vitesse de fusion.

1 .1 Protocole expérimental

Les liposomes fluorescents comportent 1,5% de lipides NBD-DOPE et 1,5% de lipides Rh-DOPE - des lipides DOPE dont la tête polaire est marquée par un fluorophore NBD ou Rh. Ces fluorophores ainsi que leurs concentrations respectives sont utilisés en routine pour mettre en évidence la fusion membranaire, depuis l'étude de Struck *et al.* [76].

Les vésicules sont préparées à une concentration de 18 mM en lipides car c'est à cette

concentration que seront ensuite menées les expériences de mesure d'énergie d'activation [1]. Les liposomes sont formés dans du Tampon A (25 mM HEPES, 100 mM KCl, pH=7,4), puis extrudés afin d'obtenir des vésicules unilamellaires (LUVs) ayant toutes une taille comparable, comme il est explicité dans l'Annexe A.

Les deux types de vésicules sont mélangés avec un rapport d'une vésicule fluorescente pour sept vésicules non marquées. L'excès de vésicules non fluorescentes est choisi de sorte que la probabilité qu'une vésicule marquée fusionne avec une vésicule non marquée soit bien plus importante que celle où elle fusionnerait avec une autre vésicule fluorescente. En effet, dans ce dernier cas, aucun signal n'accompagnerait la fusion puisqu'il n'y aurait pas de dilution de fluorescence. Ainsi, utiliser trop peu de liposomes fluorescents ne permet pas d'avoir un signal suffisant mais en avoir trop résulte également en une décroissance du signal.

Le mélange est réalisé dans un puits d'une plaque transparente (# 353072 Falcon), et l'intensité de fluorescence du NBD mettant en évidence le partage de lipides est suivie dans le temps. Le volume de lecture minimal imposé par l'instrument étant de $50\mu L$, $7\mu L$ de liposomes fluorescents sont mélangés avec $49\mu L$ de liposomes non marqués. Pour le contrôle, les liposomes non fluorescents sont remplacés par le même volume de Tampon A - les liposomes fluorescents peuvent donc fusionner entre eux mais aucun signal n'en découle car il n'y a pas de dilution possible de fluorescence. Ce contrôle permet de suivre l'évolution temporelle de la fluorescence des vésicules marquées, indépendamment des effets de la fusion. Généralement, l'expérience et le contrôle sont chacun réalisés en parallèle dans trois puits, et les données correspondantes sont moyennées.

L'acquisition est faite dans un lecteur de plaques (SpectraMax M5e, Molecular Devices), thermalisé à une température constante, comprise entre 27°C et 47°C. Le NBD est excité à 460 nm et son émission est recueillie à 538 nm. La lecture est faite par le bas pour éviter d'éventuels artéfacts de lecture dus à une potentielle condensation d'eau sur le couvercle de la plaque lors des expériences à plus haute température.

En fin d'expérience, $50\mu L$ de Triton à 4% [2] (Triton X-100, # T8787, Sigma-Aldrich) sont ajoutés au mélange [3]. Cela permet de solubiliser les lipides pour les écarter les uns des autres. Du point de vue du FRET, c'est comme si les fluorophores avaient été dilués infiniment ; son efficacité devient donc nulle. On obtient alors le signal maximal du NBD, qui est directement relié à la quantité de sondes NBD de l'échantillon. Les données sont ensuite normalisées par ce paramètre, ce qui permet d'avoir une idée de la fraction du signal maximal qui est atteinte, et donc du degré de fusion.

Les données brutes d'une expérience typique sont présentées dans la Figure 4.1. On constate que le signal du NBD augmente dans l'échantillon, ce qui met en évidence un partage de lipides entre les vésicules. Comme le signal en fin d'expérience (signal maxi-

1. Ce choix sera discuté dans le Chapitre 5.
2. La solution est préparée en diluant 4 mL de Triton pur avec 96 mL d'eau
3. Le DDM(n-Dodecyl β-D-maltoside) est un autre détergent qui peut être utilisé dans ce but.

mal du NBD, résultant de l'ajout du détergent) est très haut, la visualisation précise de la première partie de la courbe, correspondant au suivi de la fusion, s'avère difficile. Le graphique du bas de la Figure 4.1 représente uniquement le suivi de la fusion lui-même - avant l'ajout de détergent. Par la suite, nous ne représenterons que cette partie de la courbe.

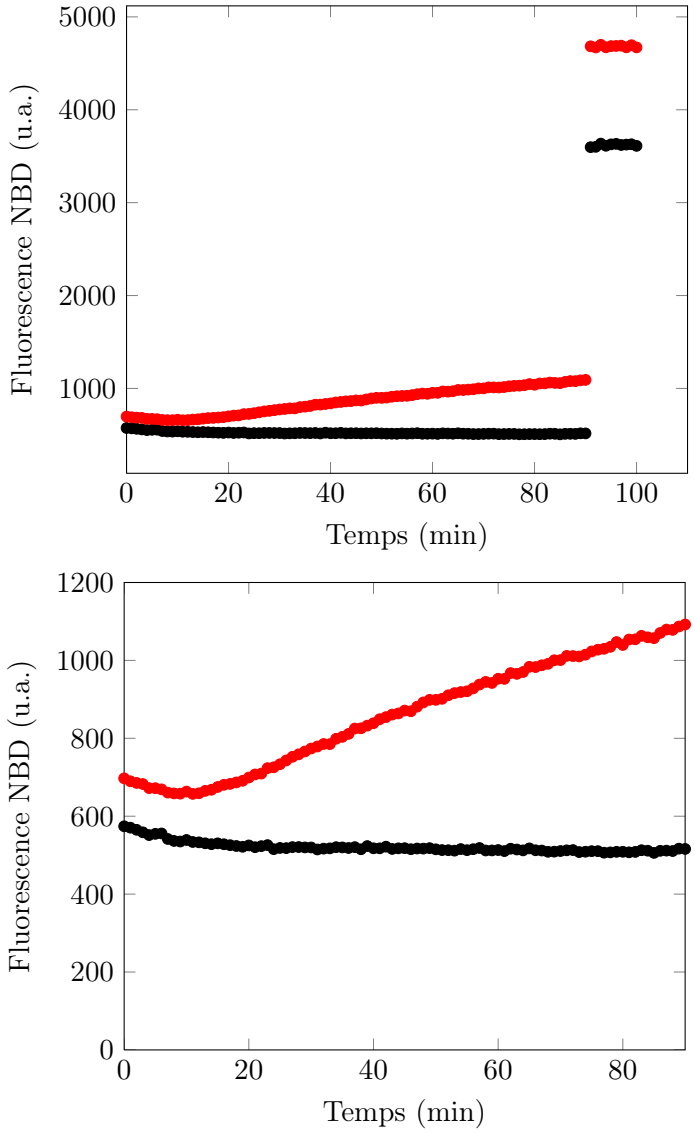
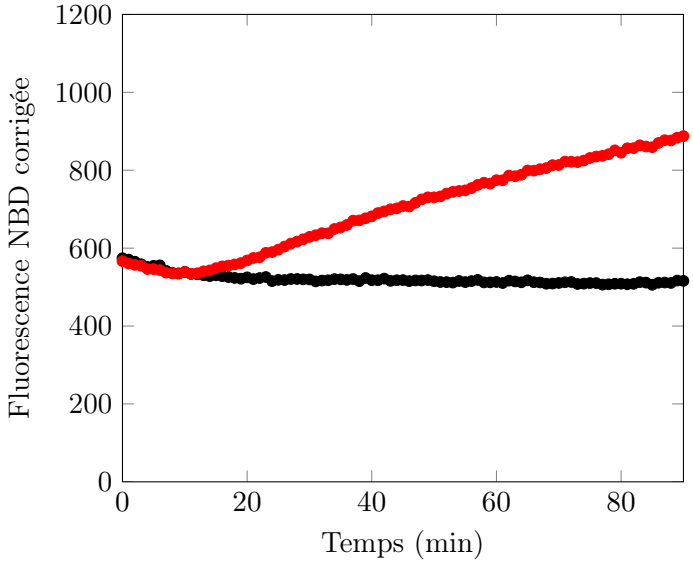


FIGURE 4.1 – **Évolution temporelle de l'intensité de fluorescence du NBD à 37°C**. La courbe rouge correspond à l'échantillon où un mélange des lipides des deux types de vésicules (fluorescentes et non marquées) a lieu. Le contrôle, où les liposomes non marqués sont remplacés par du tampon, est présenté en noir. Le signal en fin d'expérience résulte de l'ajout de détergent, pour écarter au maximum les sondes FRET, et obtenir le signal maximal du NBD, directement relié au nombre de sondes NBD. Le graphique du bas présente uniquement la première partie de la courbe. *Composition lipidique DOPC-DOPE (50:50).*

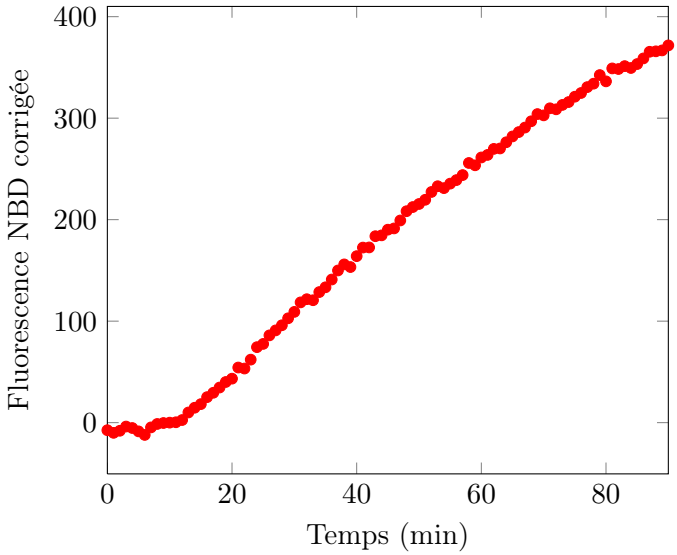
On remarque alors également que le signal NBD diminue avant de croître dans l'échantillon. Cela s'explique par l'augmentation de la température de l'échantillon par rapport à

la température à laquelle il était conservé initialement [4]. Cette décroissance s'arrête lorsque la température de l'échantillon a atteint celle imposée par le lecteur de plaques. Une fois cette dernière stabilisée, le signal peut commencer à croître. Dans le cas du contrôle, on ne retrouve évidemment que la décroissance initiale.

1 .2 Estimation de la vitesse de fusion



(a) Le signal de l'échantillon est corrigé pour être initialement au même niveau que celui du contrôle.



(b) Le signal du contrôle est retranché à celui de l'échantillon corrigé. Il reste un petit effet de la température mais bien moins important qu'auparavant.

FIGURE 4.2 – **Élimination de l'effet de la variation de température sur le signal**.

Le niveau du signal de fusion est directement lié au nombre de fluorophores pouvant

4. L'augmentation de la température entraîne, dans tous les cas, une diminution de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore. À cela s'ajoute, dans ce cas précis, le fait que l'efficacité du FRET augmente avec la température. En effet, l'agitation thermique étant accrue, les fluorophores se « voient » plus et le transfert d'énergie entre le NBD et la Rh est plus efficace. L'intensité du NBD est donc encore amoindrie.

potentiellement participer à ce signal. Il est donc plus facile d'avoir une idée de l'étendue de la fusion et de comparer plusieurs expériences entre elles en rapportant le signal de fusion au nombre total de sondes fluorescentes. Les données sont donc normalisées grâce au signal obtenu après l'ajout du détergent, relié à ce nombre de fluorophores. De plus, il peut être intéressant de se débarrasser de la variation de fluorescence de l'échantillon due à la variation de température, et de se focaliser uniquement sur l'effet de la fusion. Cela peut être fait grâce au signal du contrôle. Nous présenterons donc comment nous avons traité puis normalisé les données.

On constate tout d'abord que le signal de l'échantillon est plus haut que celui du contrôle, alors que la quantité de liposomes fluorescents est la même [5]. Pourtant, les liposomes non marqués ne fluorescent pas plus que le Tampon A à cette longueur d'onde, leur signal de fluorescence est donc nul lorsqu'ils sont seuls. Cela signifie que les liposomes non marqués font augmenter artificiellement le signal apparent des vésicules fluorescentes lorsqu'ils sont en leur contact, même s'ils ne sont pas, eux-mêmes, fluorescents [6]. Le signal du contrôle ne peut donc pas être soustrait tel quel à celui de l'échantillon. Ce dernier doit être corrigé pour que son niveau initial coïncide avec celui du contrôle (cf Figure 4.2a) ; le signal du contrôle peut alors lui être soustrait (cf Figure 4.2b). On retranche aussi au signal de l'échantillon obtenu après ajout de détergent le niveau qu'a atteint le contrôle avant l'ajout de détergent une fois la température stabilisée.

Une fois le contrôle soustrait, les données sont normalisées en fixant à 100 la valeur du signal NBD atteint après l'ajout du détergent (cf Figure 4.3).

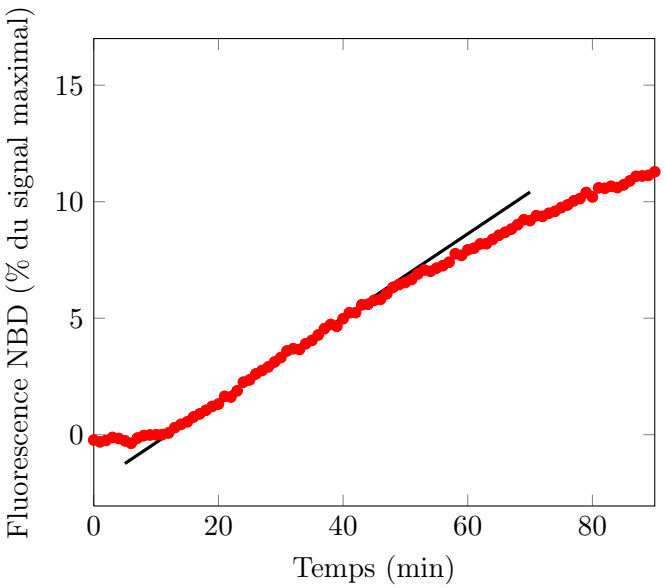


FIGURE 4.3 – **Normalisation des données**. Le signal maximal obtenu après l'ajout de détergent est fixé à 100. La pente maximale de la courbe donne une idée de la vitesse initiale de fusion.

5. C'est systématiquement le cas dans les expériences que nous avons menées.
6. Nous ne savons pas à quoi cela peut être dû. Peut-être qu'il s'agit juste d'un effet d'optique.

Cette normalisation permet d'avoir une idée du pourcentage du signal maximal qui est atteint en fin d'expérience de fusion.

La pente de la courbe finale est utilisée comme indicateur de la vitesse de fusion. On constate qu'il reste en début d'expérience un intervalle de temps où l'intensité de fluorescence du NBD ne varie pas encore de façon linéaire [7]. La vitesse de fusion initiale est donc estimée en mesurant la pente de la courbe au début de sa croissance, au moment où elle est maximale [8] (cf Figure 4.3).

2 Vitesse de fusion *normalisée*, comparable à toutes les températures

La question qui se pose alors assez naturellement est de savoir si les vitesses de fusion estimées à partir des vitesses d'augmentation de l'intensité de fluorescence du NBD normalisée sont comparables à différentes températures. En effet, elles font intervenir la variation temporelle de l'intensité de fluorescence du NBD qui est potentiellement tributaire de la température.

Nous avons donc décidé de mimer les situations initiale et finale d'une expérience dont le taux de fusion final serait fixé et connu, et de comparer ensuite les rapports de fluorescence entre ces deux situations, et cela pour les différentes températures. Cela permet de vérifier si une même dilution de fluorescence - donc un même taux de fusion - entraîne la même augmentation relative d'intensité de fluorescence du donneur à toutes les températures.

Au cours de cette expérience, nous nous sommes rendu compte que le signal atteint après l'ajout de détergent ne correspondait en fait pas au signal maximal qu'on aurait pour une dilution infinie de ce même nombre de sondes fluorescentes. De plus, l'écart entre le signal maximal après l'ajout de détergent et le « vrai » signal maximal du donneur dépend de la température, ce qui pose problème pour la comparaison d'expériences menées à différentes températures.

Dans un premier temps, il a donc fallu étudier comment le signal du NBD, résultant de l'ajout de détergent, était relié au signal maximal réel du NBD, pour que les expériences à différentes températures puissent être normalisées d'une façon qui permette de les comparer entre elles. Nous présenterons d'abord ces résultats.

Ensuite, nous reviendrons à notre objectif initial : vérifier si les « vitesses de fusion » obtenues grâce aux pentes des courbes représentant l'évolution temporelle de la fluorescence du NBD sont comparables à différentes températures.

7. Cette tendance résulte d'un effet de température et est discutée dans l'Annexe D.
8. Nous avons montré dans l'Annexe D que cette pente correspond à la pente initiale de la courbe obtenue en l'absence de décroissance initiale du signal.

2 .1 Normalisation par solubilisation des lipides

La valeur de l'intensité de fluorescence obtenue après solubilisation des lipides par ajout de détergent est généralement considérée comme étant la valeur que l'on obtiendrait pour une dilution « infinie » des sondes, en l'absence de détergent. Nous nous sommes rendu compte que cela était faux, mais que ces deux valeurs pouvaient être reliées l'une à l'autre par un facteur dépendant du détergent utilisé et de la température.

Dans cette partie, nous présenterons, dans un premier temps, comment nous avons élaboré un système permettant un espacement initial suffisant des sondes pour garantir que le FRET soit nul, et autorisant ainsi à comparer les signaux obtenus en présence et en absence de détergent, sans que la dilution des sondes résultant de l'ajout de détergent n'interfère.

Ensuite, nous expliciterons comment la valeur de fluorescence supposée maximale obtenue grâce au détergent peut être corrigée pour obtenir la vraie intensité de fluorescence de l'échantillon pour une dilution infinie. Nous nous intéresserons en particulier à la dépendance de cette correction à la température.

2 .1.1 Système mimant la dilution infinie des sondes NBD

Pour comparer les valeurs maximales réelles du signal NBD avec celles obtenues en présence de détergent, il fallait trouver une situation où les sondes étaient assez diluées pour que le FRET soit impossible et qu'il n'y ait pas besoin de dilution supplémentaire pour obtenir le signal maximal du donneur.

Pour cela, nous avons préparé une série de vésicules comprenant des fractions décroissantes de lipides fluorescents (de 1,5% à 0,0003% de lipides NBD-DOPE et Rh-DOPE), en espérant atteindre une concentration en fluorophores assez faible pour que le FRET soit proche de zéro, et que le signal du NBD ait son niveau maximal.

Le principe est de comparer les intensités de fluorescence de différents échantillons, comprenant la même quantité de sondes fluorescentes mais plus ou moins espacées. À titre d'exemple, on peut comparer l'intensité de fluorescence de 10 μL de liposomes fluorescents comprenant 1% de lipides fluorescents avec celle de 100 μL de liposomes comportant 0,1% de lipides fluorescents. L'intensité de fluorescence du deuxième échantillon est censée être plus élevée, sachant que le FRET est moins efficace.

Étant donnée la gamme de concentration balayée, il n'est pas possible d'avoir des variations de volume aussi importantes. Nous avons donc réalisé plusieurs séries d'échantillons, à l'intérieur desquelles les quantités de lipides fluorescents étaient gardées constantes (cf Figure 4.4). De plus, comme nous nous sommes rendu compte que les lipides non marqués pouvaient participer au signal global de fluorescence lorsqu'ils étaient au contact de liposomes fluorescents (cf Figure 4.1), nous avons également décidé de garder le nombre de lipides non marqués constant (cf Figure 4.4). Les séries se chevauchent pour vérifier que les résultats sont semblables même si la quantité totale de lipides fluorescents n'est pas la même.

Les intensités de flurorescence du NBD de ces solutions ont été mesurées à 37°C dans le lecteur de plaques. Ces intensités ont été divisées par le nombre total de fluorophores présents dans la solution, qui est le même pour les échantillons faisant partie d'une même série. Cela permet d'obtenir une intensité de fluorescence par molécule de NBD et que les résultats des différentes séries soient comparables entre eux.

Les échantillons présentant un même pourcentage de lipides fluorescents dans les liposomes marqués donnent des résultats semblables dans les différentes séries, même si la quantité totale de lipides fluorescents n'est pas la même. Nous pouvons donc moyenner les résultats obtenus pour la même condition dans les différentes séries (par exemple tous ceux indiqués par une flèche rouge). Néanmoins, étant donnée la faible intensité de fluorescence des échantillons à plus faibles fractions de lipides fluorescents, seuls les signaux les plus élevés - mesurés pour le plus grand volume de liposomes marqués sont gardés.

Lipides fluorescents (%)	Liposomes fluorescents (μL)	Liposomes non marqués (μL)
1,5	6,66	93,33
0,75	13,32	86,68
0,1	100	0
Lipides fluorescents (%)	Liposomes fluorescents (μL)	Liposomes non marqués (μL)
0,1	10	90
0,03	33	67
→ 0,01	100	0
Lipides fluorescents (%)	Liposomes fluorescents (μL)	Liposomes non marqués (μL)
0,03	10	90
→ 0,01	30	70
0,003	100	0
Lipides fluorescents (%)	Liposomes fluorescents (μL)	Liposomes non marqués (μL)
→ 0,01	10	90
0,003	33	67
0,001	100	0
Lipides fluorescents (%)	Liposomes fluorescents (μL)	Liposomes non marqués (μL)
0,003	10	90
0,001	30	70
0,0003	100	0

FIGURE 4.4 – **Échantillons possédant différentes fractions de lipides fluorescents dans les liposomes marqués**. Au sein de chaque série d'expériences, la quantité totale de lipides (fluorescents et non marqués) est gardée constante, mais les lipides fluorescents sont plus ou moins écartés les uns des autres, en étant incorporés dans plus ou moins de liposomes différents. Les différentes séries se recoupent (cf flèches rouges) pour s'assurer que le nombre total de fluorophores n'impacte pas les résultats. Les échantillons marqués en vert sont ceux dont les données ont été reportées dans la Figure 4.5.

La Figure 4.5 représente l'intensité de fluorescence par molécule de NBD en fonction du pourcentage de lipides NBD et Rh dans les vésicules marquées. On constate que plus la proportion de lipides fluorescents dans les liposomes diminue, plus l'intensité de fluorescence par molécule de NBD augmente. Elle atteint un plateau lorsque la fraction de ces lipides

atteint environ 0,003% des lipides totaux. Cela signifie que l'efficacité du FRET devient nulle quand les lipides fluorescents représentent moins de 0,003% des lipides totaux. Les fluorophores sont alors suffisamment espacés pour présenter leur fluorescence maximale, qu'ils auraient s'ils étaient seuls.

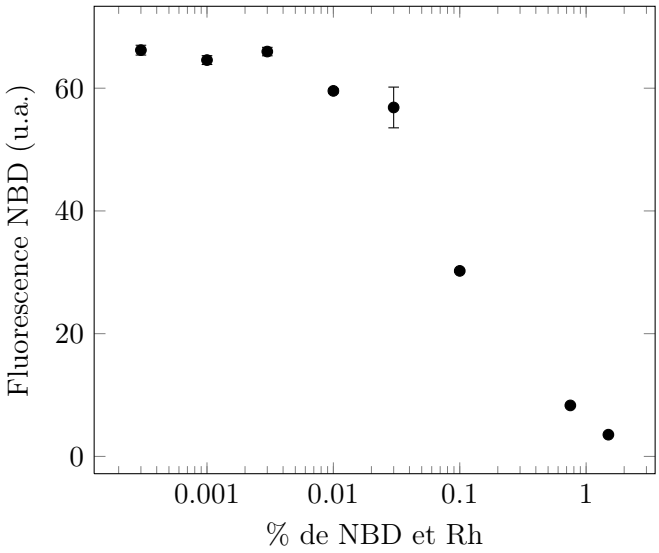


FIGURE 4.5 – **Intensité de fluorescence par molécule de NBD en fonction de la fraction de lipides fluorescents dans les liposomes**. La fluorescence par molécule de NBD augmente quand la concentration en fluorophores diminue, jusqu'à atteindre un plateau lorsque les fluorophores sont trop écartés pour que du FRET puisse avoir lieu. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de quatre mesures faites par échantillon. Elles sont souvent plus petites que les symboles.

2 .1.2 Correction de la valeur obtenue par l'ajout de détergent

Pour des fractions de lipides fluorescents inférieures ou égales à 0,003%, les lipides NBD ont donc leur fluorescence maximale. L'ajout de détergent à ce type d'échantillons permet de comparer la valeur d'intensité de fluorescence supposée maximale en présence de détergent avec le signal maximal réel, déjà atteint avant l'ajout de celui-ci. Le Triton et le DDM, deux détergents habituellement utilisés pour la normalisation des données de tests de fusion, ont été examinés.

$100\mu L$ de liposomes fluorescents à 18 mM en lipides, possédant 0,003%, 0,001% ou 0,0003% de lipides fluorescents, ont été traités avec $100\mu L$ de Triton 4% ou de DDM 5%.

Les intensités de fluorescence de chaque échantillon ont été mesurées à 37°C avant et après ajout du détergent. Chacune de ces intensités a alors été divisée par le nombre de fluorophores contenus dans l'échantillon. L'intensité moyenne avant ajout de détergent donne une estimation de l'intensité maximale de fluorescence d'une molécule de NBD (en l'absence de FRET).

Les intensités de fluorescence en présence de détergent ont été normalisées par cette

valeur, puis les données des trois échantillons ont été moyennées. Elles sont présentées dans la Figure 4.6. On constate que le niveau de fluorescence est plus bas en présence de détergent qu'en son absence.

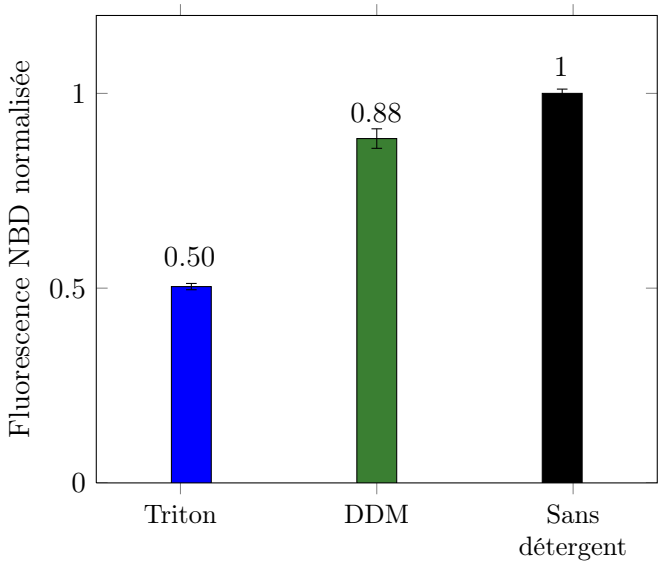


FIGURE 4.6 – **Intensités de fluorescence d'un échantillon « infiniment dilué » en présence et en absence de détergent (Triton ou DDM)**. La présence de détergent n'est pas censée changer le FRET, l'échantillon étant initialement suffisamment dilué. En revanche, l'environnement du fluorophore change en présence de détergent, et son intensité de fluorescence diminue (plus pour le Triton que pour le DDM). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types des mesures des trois différents échantillons (trois différentes fractions de lipides marqués).

S'il n'y a pas assez de détergent, les lipides fluorescents sont plus écartés les uns des autres dans les liposomes que lorsqu'ils sont incorporés dans les micelles de détergent, trop peu nombreuses. Cela pourrait expliquer la décroissance du signal lors de l'ajout du détergent. Pourtant, nous avons ajouté plus de détergent aux échantillons et les signaux n'ont pas augmenté ; la quantité initiale de détergent ajoutée était donc suffisante. Nous pensons donc que c'est l'environnement comprenant du détergent qui, en soi, amoindrit l'intensité de fluorescence du NBD [9]. Le fait que les valeurs obtenues avec le Triton et le DDM soient différentes conforte cette hypothèse.

Ainsi, la valeur de l'intensité de fluorescence obtenue en ajoutant du détergent serait bien reliée à la quantité de lipides NBD, s'il y a assez de détergent, mais elle serait modifiée par la présence de celui-ci. Il semble donc possible de déduire la valeur réelle maximale de l'intensité de fluorescence - qui serait obtenue pour une dilution infinie - à partir de celle obtenue en présence de détergent. Il suffit, pour cela, de la multiplier par un facteur correctif α_{D}, dépendant du détergent, correspondant à l'inverse des rapports de fluorescence obtenus pour l'échantillon « infiniment dilué » en présence et en absence de détergent (*i.e*

9. Il est courant de voir la fluorescence d'une molécule (aussi bien son intensité que la forme du spectre d'émission) changer avec le solvant dans lequel elle est solubilisée. C'est en particulier le cas des lipides fluorescents solubilisés dans du chloroforme ou dans une solution aqueuse.

par $\frac{1}{0,88} = 1,136$ pour le DDM et $\frac{1}{0,50} = 2$ pour le Triton).

Pour vérifier si ce facteur correctif est valide dans des conditions classiques d'expérience de fusion, nous avons comparé les fluorescences obtenues en ajoutant du Triton et du DDM à un échantillon possédant 1,5% de lipides NBD et Rh. Évidemment, la valeur pour une dilution infinie n'est pas accessible dans ce cas. Si, pour autant, les valeurs obtenues pour les deux détergents conservent le même rapport que pour une concentration bien plus faible, cela tend à prouver que le facteur correctif ne dépend pas de la concentration des fluorophores.

Pour cela, nous avons mesuré les intensités de fluorescence à 37°C de $50\mu L$ de liposomes à 1mM comprenant 1,5% de lipides fluorescents en présence de $50\mu L$ de Triton ou de DDM. La valeur obtenue pour le DDM a été artificiellement fixée à 0,88 - la valeur que nous avions pour les liposomes comprenant moins de 0,01% de lipides fluorescents (cf Figure 4.6). La valeur obtenue en présence de Triton a été corrigée proportionnellement pour qu'elle lui soit comparable. Elles sont représentées dans la Figure 4.7.

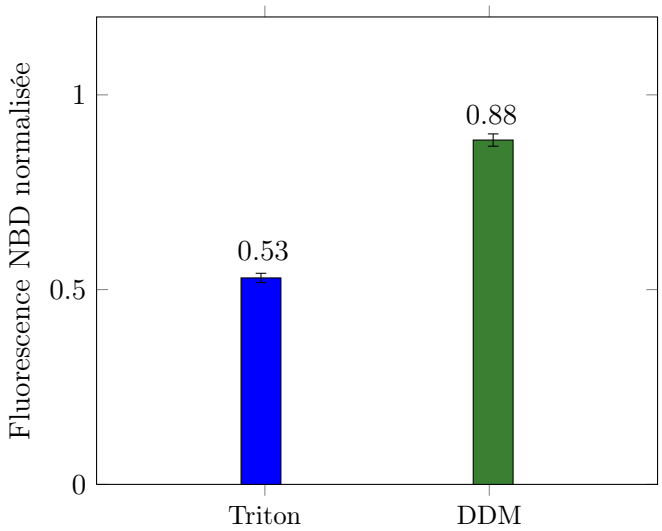


FIGURE 4.7 – **Intensités de fluorescence de liposomes comportant 1,5% de lipides fluorescents en présence de Triton ou de DDM**. Le rapport des deux intensités de fluorescence est conservé par rapport au cas où les liposomes contenaient assez peu de lipides fluorescents pour que le FRET soit nul avant l'ajout de détergent. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types de dix mesures réalisées à partir d'un même échantillon.

Le rapport des deux intensités de fluorescence est conservé. On partira donc du principe que les corrections à apporter aux valeurs obtenues grâce au détergent pour obtenir l'intensité réelle maximale ne dépendent pas de la concentration de fluorophores, sous réserve, bien évidemment, qu'il y ait assez de détergent pour solubiliser tous les lipides.

L'étape suivante consistait alors à vérifier si les facteurs correctifs α_{D} dépendaient de la température. En effet, les vitesses de fusion, estimées comme il a été explicité en début de chapitre, son normalisées grâce au signal obtenu en présence de détergent. Que cette

normalisation soit relative, le signal maximal obtenu n'étant pas le signal maximal réel, importe finalement peu, mais si cette normalisation dépend de la température, les vitesses de fusion ne seront pas comparables entre elles.

Pour cela, nous nous sommes focalisés sur une seule concentration initiale de sondes fluorescentes - 0,001%. $100\mu L$ de liposomes à 18mM ont été traités avec $100\mu L$ de Triton ou de DDM. Les intensités de fluorescence ont été mesurées avant et après ajout de détergent. Contrairement à précédemment, trois expériences indépendantes ont été réalisées dans le cas du Triton (et deux pour le DDM), pour avoir une meilleure estimation des facteurs correctifs en fonction de la température.

La Figure 4.8a représente les rapports de fluorescence entre avant et après ajout de détergent en fonction de la température, pour le Triton et le DDM. On constate, tout d'abord, que les valeurs obtenues à 37°C correspondent sensiblement aux valeurs mesurées dans la première expérience (cf Figure 4.6), ce qui montre que la mesure faite sur une seule concentration semble suffisante pour obtenir une estimation satisfaisante des facteurs correctifs. On remarque aussi que les rapports changent avec la température. Les intensités de fluorescence maximales obtenues après ajout de détergent sont donc sous-estimées, comme on l'avait vu dans la première partie, mais, de surcroît, la sous-estimation varie avec la température. La correction à apporter aux valeurs des signaux en présence de détergent pour avoir leur valeur maximale réelle dépend donc également de la température (cf Figure 4.8b), et devient de ce fait nécessaire pour permettre la comparaison entre les expériences menées à différentes températures.

La Figure 4.9 représente la même courbe que celle de la Figure 4.3, mais avec des corrections correspondant à différentes températures.

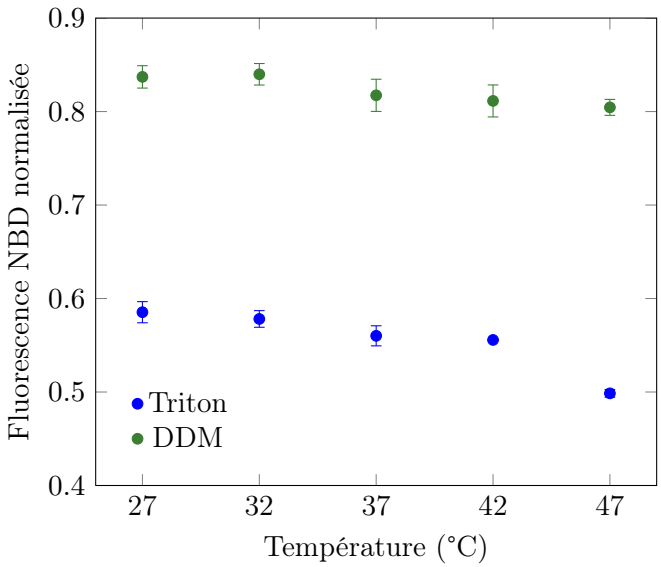
On remarque, tout d'abord, que le taux de fusion apparent est logiquement plus grand lorsque les données ne sont pas corrigées, le signal maximal du donneur étant sous-estimé.

On constate également qu'en fonction de la température, la correction est différente. La façon de normaliser les données qui a été présentée dans la première partie de ce chapitre ne permet donc pas de comparer entre elles les données acquises à différentes températures. En revanche, si les valeurs maximales du signal sont corrigées par les facteurs de correction $\alpha_{\mathrm{D}}(T)$, elles seront alors comparables.

2 .2 Diminution du FRET par dilution des lipides

L'objectif suivant est de comparer les augmentations relatives de fluorescence du NBD lors d'une dilution double des sondes, à différentes températures. En effet, lors d'un événement de fusion entre une vésicule fluorescente et une vésicule non marquée de mêmes tailles, les fluorophores finissent deux fois plus espacés que dans la situation initiale. Si les augmentations relatives de fluorescence ne sont pas les mêmes à toutes les températures, alors que la dilution est la même, cela signifie que, si on se fonde sur la vitesse d'augmentation de la fluorescence du donneur pour estimer la vitesse de fusion, cette dernière sera sous-estimée pour certaines températures.

Dans cette optique, nous avons donc élaboré deux échantillons (1 et 2), mimant la



(a) Fluorescence d'un échantillon en présence de détergent normalisée par sa fluorescence maximale en fonction de la température. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types des trois différentes expériences pour le Triton (deux, pour le DDM).

Détergent \ Température	27°C	32°C	37°C	42°C	47°C
Triton	1.71	1.73	1.79	1.80	2.00
DDM	1.20	1.19	1.22	1.23	1.24

(b) Les facteurs α_{D} dépendent également de la température.

FIGURE 4.8 – **Facteurs correctifs** $\alpha_{\mathbf{D}}(T)$. Ces facteurs permettent de passer de l'intensité de fluorescence en présence de détergent à l'intensité de fluorescence qu'aurait le même échantillon aussi dilué mais en l'absence de détergent.

situation initiale d'une expérience classique de fusion, et la situation finale d'une telle expérience où toutes les vésicules fluorescentes auraient fusionné une fois avec une vésicule non marquée de même taille (cf Figure 4.10).

Le premier échantillon (1) contient donc des vésicules fluorescentes comportant 1.5% de lipides Rh et 1.5% de lipides NBD. Le deuxième échantillon (2) contient des vésicules deux fois moins fluorescentes (0.75% de lipides Rh et 0.75% de lipides NBD), qui sont des objets du type de ceux qui résultent de la fusion d'une vésicule fluorescente avec une vésicule non marquée de taille similaire. Les vésicules de la situation finale sont en général deux fois plus grandes qu'initialement, mais il est difficile de fabriquer des vésicules d'exactement la bonne taille. Étant donné que l'on rapporte les signaux au nombre total de fluorophores et que l'on s'intéresse uniquement à l'augmentation relative de fluorescence par molécule de NBD lors de la dilution, le nombre de vésicules que comporte l'échantillon 2 n'importe pas, et ce dernier mime donc bien la situation « après fusion ».

L'augmentation relative de l'intensité de fluorescence du donneur résultant de la fusion de deux vésicules de taille similaire (AR_{dil2}) peut être estimée à partir de la différence relative des intensités de fluorescence normalisées des échantillons 1 et 2 (cf Équation 4.1).

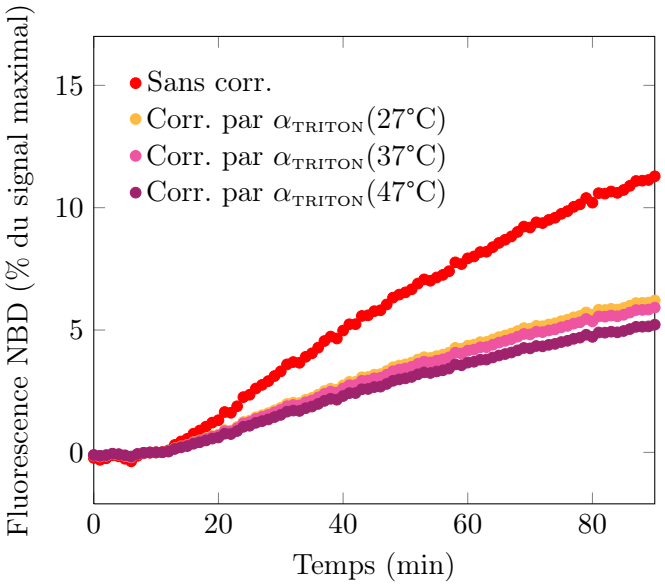


FIGURE 4.9 – **Effet de la correction par $\alpha_{\text{TRITON}}(T)$.** La courbe présentée en Figure 4.3 est représentée en rouge. Les autres courbes correspondent aux mêmes données, mais où le signal maximal obtenu après l'ajout de détergent a été corrigé par $\alpha_{\text{TRITON}}(T)$ avant d'être fixé à 100. Sans correction, l'étendue de la fusion semble plus importante.

$$AR_{dil2} = \frac{I^2_{norm} - I^1_{norm}}{I^1_{norm}} \tag{4.1}$$

où

$$I^i_{norm} = \frac{I^i}{I^i_\infty} \tag{4.2}$$

avec I^i, l'intensité de fluorescence du NBD de l'échantillon i, où i peut correspondre à la population 1 ou 2, et I^i_∞, la valeur de l'intensité de fluorescence du NBD de l'échantillon i après ajout de détergent et correction par le facteur correctif $\alpha_{\text{D}}(T)$, ici $\alpha_{\text{DDM}}(T)$.

Notre population 1 contient $7\mu L$ de liposomes fluorescents (1,5% NBD-PE - 1,5% Rh-PE) et la population 2, $7\mu L$ de liposomes comportant 0,75% de lipides NBD-PE et 0,75% de Rh-PE. Les deux solutions de liposomes sont à 18 mM en lipides. $49\mu L$ de Tampon A sont ajoutés aux échantillons pour que le volume total soit convenable pour une lecture au lecteur de plaques. Les intensités de fluorescence des deux populations sont mesurées avant et après ajout de $50\mu L$ de DDM 5%.

Les symboles pleins de la Figure 4.11 représentent, en fonction de la température, les augmentations relatives de fluorescence entre l'échantillon 1 et 2 - reproduisant celles qui auraient lieu lors d'un cycle de fusion. On remarque que l'augmentation relative d'intensité de fluorescence du NBD entre le système « avant fusion » et le système « après fusion » est plus basse à haute température. Cela signifie que, pour une même dilution - correspondant à un même taux de fusion -, l'augmentation de fluorescence sera plus faible à haute température. Si on utilise directement la vitesse d'augmentation de la fluorescence du NBD pour quantifier la vitesse de fusion, cette dernière sera donc sous-estimée à haute température.

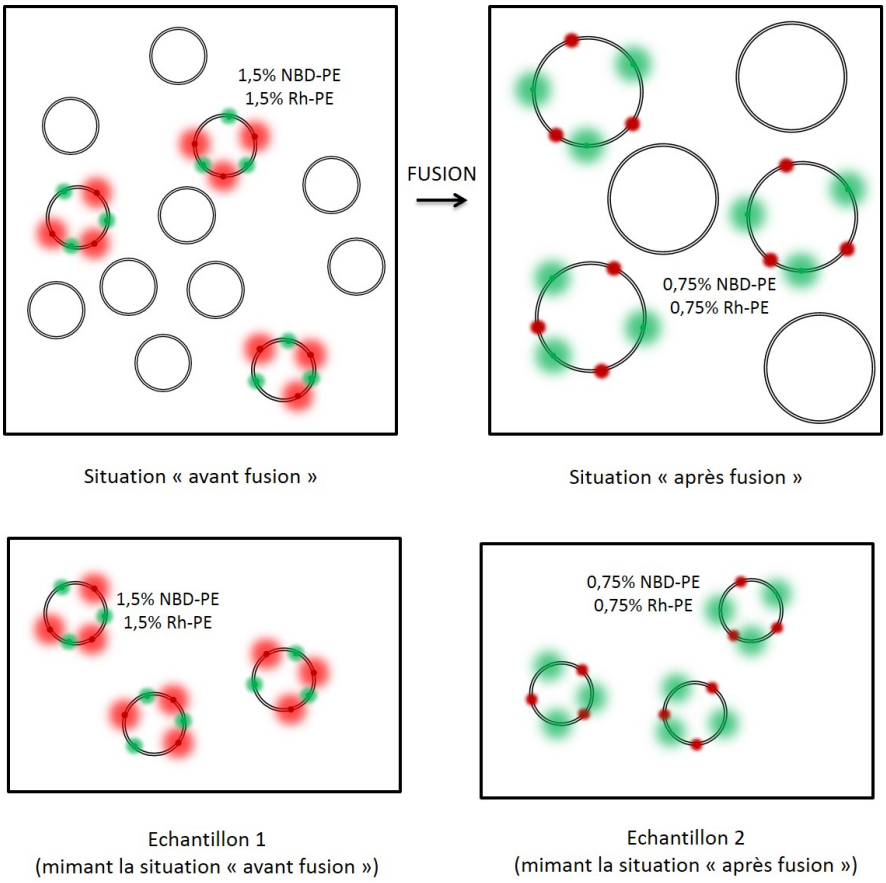


FIGURE 4.10 – **Échantillons mimant les situations initiale et finale d'une expérience de fusion dont l'avancement serait contrôlé**.*Haut :* Dans une expérience de fusion entre des vésicules fluorescentes (1,5% de lipides NBD et 1,5% de lipides Rh) et des vésicules non marquées où toutes les vésicules fluorescentes auraient fusionné avec une vésicule non marquée (1 cycle de fusion), n vésicules fluorescentes donnent naissance à n vésicules fluorescentes deux fois plus grandes et contenant deux fois moins de fluorophores par unité de surface (0,75% de lipides NBD et 0,75% de lipides Rh). La fluorescence de la situation finale est accrue par la dilution des sondes. *Bas :* Pour mimer ces situations, deux échantillons (1 et 2) sont constitués. Pour l'échantillon 2, comme on ne peut pas faire des vésicules exactement deux fois plus grandes, nous avons travaillé avec des vésicules de la même taille que celles de la population 1 (contenant, en revanche, bien évidemment, une fraction de fluorophores deux fois moindre). Le nombre de fluorophores n'est donc pas le même, mais comme les fluorescences sont rapportées au nombre de sondes fluorescentes, cela ne pose pas de problème. La différence relative des intensités de fluorescence par molécule de NBD entre les échantillons 1 et 2 correspond à l'augmentation relative de fluorescence par molécule de NBD survenant lors de l'expérience de fusion schématisée en haut de la figure. Elles peuvent donc être comparées aux différentes températures pour voir si un même taux de fusion (ici fixé à un cycle) est accompagné d'une même augmentation relative de l'intensité de fluorescence du NBD.

De ce fait, il faut ajouter un facteur correctif pour convertir les vitesses d'augmentation de l'intensité de fluorescence du NBD en vitesses de fusion, qui seront alors comparables à différentes températures.

Les données représentées par les symboles pleins de la Figure 4.11 sont bien ajustées

par une droite. Nous avons donc réévalué les valeurs de AR_{dil2} en utilisant l'équation de cette droite. Elles sont représentées par les symboles vides dans la Figure 4.11. Les facteurs correctifs ont ensuite été déterminés en prenant les inverses de ces valeurs et en les normalisant de façon à ce que le facteur correctif pour 27°C soit égal à 1. Ils sont répertoriés dans la Figure 4.12.

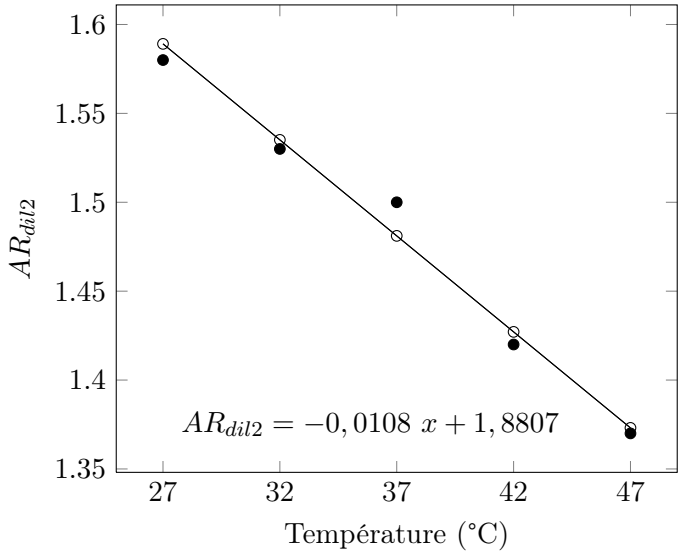


FIGURE 4.11 – **Augmentation relative de la fluorescence du NBD du fait de la dilution double des sondes lumineuses en fonction de la température**. Les symboles pleins correspondent aux mesures et les symboles vides représentent leur réévaluation en fonction de l'ajustement des données expérimentales.

Température	27°C	32°C	37°C	42°C	47°C
$\gamma(T)$	1	1.035	1.073	1.114	1.157

FIGURE 4.12 – **Facteurs $\gamma(T)$ à appliquer aux vitesses d'augmentation de l'intensité de fluorescence du NBD pour passer aux vitesses de fusion, en fonction de la température**.

Les facteurs correctifs $\gamma(T)$ permettent de palier la sous-estimation de la vitesse de fusion à haute température, lorsque l'on se fonde sur la cinétique d'augmentation d'intensité de fluorescence du NBD. Ainsi, grâce à la loi d'Arrhenius, on peut remonter à l'énergie d'activation de la fusion.

Nous venons de voir qu'une même dilution de fluorescence n'était pas accompagnée d'une même augmentation relative de fluorescence du NBD à différentes températures. Nous présenterons ci-dessous une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène.

Une augmentation de température peut être considérée comme étant à peu près semblable à une augmentation de la concentration en fluorophores. En effet, la température étant accrue, l'agitation thermique l'est aussi, et les fluorophores se rencontrent plus souvent, donc se « voient » plus, comme s'ils étaient plus concentrés. La concentration apparente s'élève donc à haute température, et l'efficacité du FRET aussi [10].

10. C'est le même effet qui avait été introduit en début de chapitre, pour expliquer une partie de la

Comme l'efficacité du FRET n'est pas une fonction linéaire de la concentration, une même dilution n'engendrera pas la même diminution de l'efficacité du FRET à toutes les concentrations apparentes, donc toutes les températures. Cela revient à avoir toujours la même dilution, quelque soit la température, mais ne partant pas de la même concentration initiale. Pour illustrer cela, on peut se pencher sur les deux cas extrêmes : soit la concentration apparente initiale est tellement élevée que la dilution n'est pas suffisante pour avoir d'augmentation de fluorescence lors de la dilution, soit elle est si faible que le FRET n'est déjà plus efficace et qu'une dilution plus poussée ne change plus rien. Dans notre cas, il faut manifestement une dilution plus importante pour avoir la même augmentation d'intensité de fluorescence du NBD à haute température.

Afin d'obtenir une estimation de la vitesse de fusion qui soit comparable à toutes les températures, le signal NBD en présence de détergent est d'abord corrigé par le facteur $\alpha_{\mathrm{D}}(T)$ correspondant à sa température, avant d'être fixé à 100 comme il avait été présenté dans la Figure 4.9. Un exemple est présenté dans la Figure 4.13a.

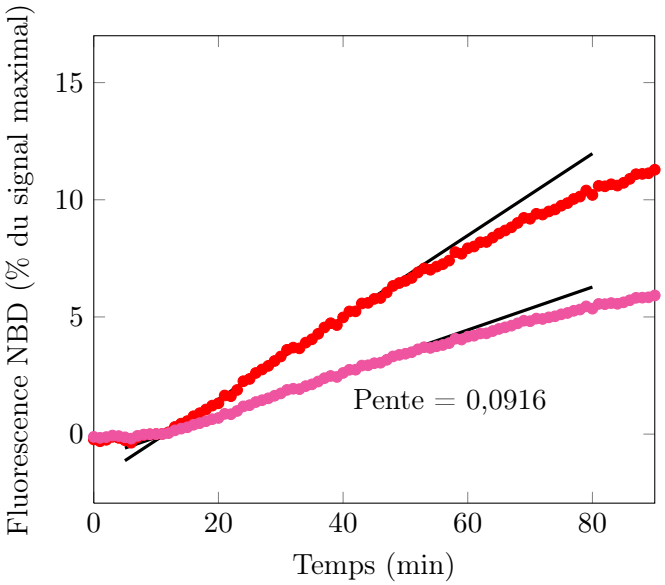
L'étendue réelle de la fusion est moins importante que ce qu'il semblait lorsque les signaux n'étaient pas corrigés et ce, d'autant plus à haute température.

La pente de la courbe, reliée à la vitesse initiale de fusion, peut alors être extraite.

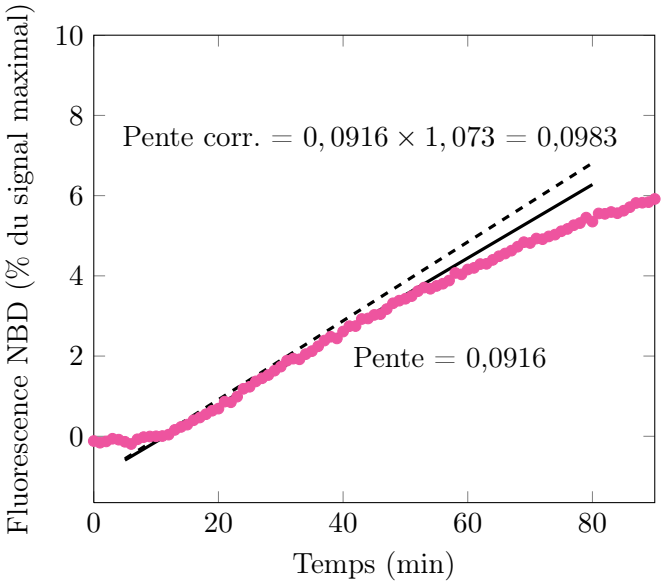
Celle-ci est ensuite corrigée par le facteur correctif $\gamma(T)$ correspondant à sa température, pour compenser le fait qu'une même étendue de fusion ne donne pas le même signal à toutes les températures (cf Figure 4.13b).

La pente corrigée correspond à l'estimation de la vitesse de fusion avec laquelle nous travaillerons, et que nous nommerons *vitesses de fusion normalisée* par la suite.

baisse initiale du signal NBD en début d'expérience, lorsque la température de l'échantillon augmentait pour atteindre celle fixée par le lecteur de plaques.



(a) La courbe résultant du traitement de données habituel, qui avait été présentée dans la Figure 4.3 est représentée en rouge. La courbe rose correspond aux mêmes données, mais le signal maximal obtenu après l'ajout de détergent a été corrigé par $\alpha_{\text{TRITON}}(37°\text{C})$ avant d'être fixé à 100. La pente est alors réduite.



(b) La pente obtenue est ensuite corrigée par γ (37°C) pour palier la sous-estimation de la vitesse à haute température. La pente corrigée (pente corr.) donne la *vitesse de fusion normalisée*, qui sera comparable à toutes les températures.

FIGURE 4.13 – **Correction des données permettant l'estimation d'une vitesse de fusion comparable à toutes les températures**.

Chapitre 5

Énergie d'activation de la fusion de vésicules de POPC

Dans un premier temps, afin de mettre au point notre protocole expérimental, nous avons choisi de travailler avec des vésicules lipidiques composées d'un seul type de lipides pour avoir le système le plus simple possible.

La majorité des lipides des membranes naturelles présentent deux chaînes carbonées contenant entre 16 et 18 carbones [1] [84]. De plus, nombreux sont les lipides membranaires dont les deux chaînes aliphatiques ont une longueur différente, et dont l'une seulement est saturée [85]. Le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ou 16:0-18:1 PC) nous est donc apparu comme un lipide de choix pour la mise au point de notre protocole.

Nous expliciterons, tout d'abord, le choix réalisé concernant la concentration en lipides, et donc en vésicules, à laquelle nous avons travaillé.

Ensuite, nous présenterons comment les tailles des liposomes ont été déterminées, et les résultats obtenus. Ceci est important car l'énergie d'activation de la fusion dépend très probablement de la courbure, et donc de la taille des vésicules [86, 87].

Nous reviendrons alors sur les différentes approches nous ayant permis de vérifier si notre protocole nous permettait bien de mettre en évidence la fusion de vésicules, et pas un autre processus pouvant engendrer un partage de lipides.

Nous présenterons enfin les valeurs d'énergie d'activation obtenues pour la fusion de vésicules de POPC.

1 Choix de la concentration de travail

Dans cette étude, nous cherchons à mesurer l'énergie d'activation de la fusion de vésicules lipidiques. Nous partirons donc du principe que nous arrivons à l'observer pour choisir la concentration en lipides qui sera utilisée dans les différentes expériences. Bien entendu, il faudra par la suite vérifier que le processus étudié correspond bien à de la fusion.

1. Une chaîne trop courte a tendance à déstabiliser la membrane tandis qu'une chaîne trop longue la rigidifie trop. Les chaînes contenant entre 16 et 18 carbones permettent d'obtenir un bon équilibre entre ces deux tendances [84].

Le processus de fusion de vésicules inclut deux étapes distinctes mais cinétiquement couplées : la rencontre des vésicules et leur fusion [88]. Dans le cas général, si la concentration en vésicules est très basse, la fréquence de leurs rencontres est faible par rapport à la probabilité de fusion une fois en contact. C'est donc surtout la cinétique de rencontre qui gouverne la cinétique globale de la fusion. Si la concentration est suffisamment élevée, en revanche, la cinétique globale sera essentiellement régie par celle de la fusion [88].

Dans notre cas, nous étudions la fusion spontanée des vésicules et la majorité des collisions ne sont pas assez énergétiques pour engendrer leur fusion. Les cinétiques de rencontre et de fusion elle-même dictent donc, ensemble, la cinétique globale de fusion. Or, pour quantifier l'énergie d'activation, il nous faut déterminer l'augmentation de la vitesse intrinsèque de la fusion avec la température, et pas celle du processus global. Comme la fréquence des collisions entre vésicules, et donc le taux de rencontres, évolue linéairement avec $k_B T$ [89] et que la vitesse intrinsèque de fusion varie, elle, de manière exponentielle avec l'inverse de la température, c'est la contribution exponentielle qui dominera. De ce fait, comparer les vitesses globales de fusion à différentes températures revient pratiquement à uniquement se focaliser sur l'évolution de la vitesse intrinsèque de fusion.

Le choix de la concentration n'est pas, en soi, déterminant pour la mesure de l'énergie d'activation. En effet, une faible concentration en vésicules limite la cinétique de fusion tout comme une concentration importante accroît la vitesse de fusion, mais les vitesses de fusion aux différentes températures sont influencées de la même façon, donc l'estimation de l'énergie d'activation est possible. Néanmoins, la concentration en vésicules doit rester assez faible pour que la solution soit suffisamment diluée pour satisfaire à la théorie des collisions, et que la loi d'Arrhenius puisse être appliquée.

Il est toutefois nécessaire d'avoir une concentration assez élevée en liposomes, de façon à ce que la fusion spontanée soit détectable, et qu'elle ne soit pas encore plus limitée par la rareté des événements de rencontre entre vésicules. Accroître la concentration en vésicules permet d'augmenter la fréquence de collisions entre les particules, et donc la possibilité de fusion.

Le choix de la concentration de travail est donc primordial et un compromis est nécessaire. Ainsi, il faut trouver une gamme de concentration sur laquelle le mélange de lipides soit détectable et dont l'énergie d'activation soit constante. En effet, le fait que cette dernière ne varie pas avec la concentration est la preuve que le régime est suffisamment dilué pour appliquer la théorie des collisions et la loi d'Arrhenius.

On rappelle qu'afin d'obtenir l'énergie d'activation E_{A} du mélange de lipides, les vitesses de fusion spontanée $v(T)$ sont corrélées à $\frac{1}{k_B T}$, avec T la température à laquelle la vitesse de fusion $v(T)$ est mesurée. La fonction $v(T)$ doit être une exponentielle dont le taux de croissance dépend de E_{A}.

Nous avons travaillé avec trois différentes concentrations en lipides - 6, 12 et 18 mM - de façon à comparer les énergies respectivement trouvées dans les trois cas. Pour chacune de

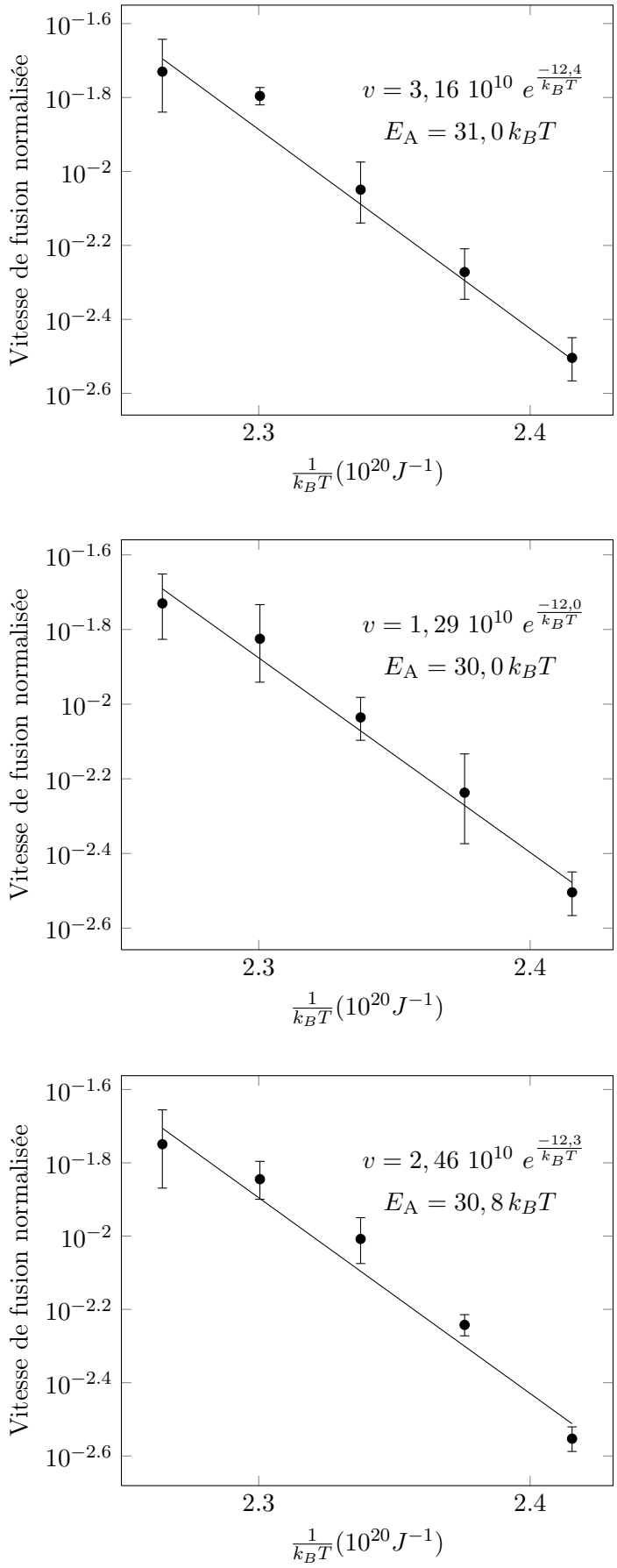


FIGURE 5.1 – **Comparaison des valeurs d'énergie d'activation obtenues à différentes concentrations en lipides**. Les courbes correspondent à 6 mM (haut), 12 mM (milieu) et 18 mM (bas).

ces concentrations, les vésicules (fluorescentes et non marquées) ont été incubées ensemble aux différentes températures [2] et nous nous sommes assurés que l'intensité de fluorescence du NBD, mettant en évidence le partage de lipides, augmentait de façon détectable dans tous les cas [3].

Les données ont ensuite été traitées comme il a été explicité dans le Chapitre 4 (contrôle soustrait, signal NBD exprimé en pourcentage de son signal maximal obtenu en présence de détergent et corrigé par les deux facteurs de correction permettant la comparaison de ces valeurs aux différentes températures) pour obtenir les vitesses de fusion normalisées. Celles-ci ont ensuite été corrélées aux différentes températures, pour déterminer l'énergie d'activation du processus.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 5.1. Les valeurs des vitesses de fusion normalisées reportées sur le graphique correspondent aux valeurs moyennes obtenues à partir de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur, à l'écart-type de ces valeurs. Les ajustements des données par des exponentielles ont été obtenus avec le logiciel Excel. La pente de ces droites (en échelle semi-logarithmique) est $\frac{-10^{20}\,E_{\mathrm{A}}}{k_B T}$, puisque les valeurs des abscisses sont exprimées en unité de $10^{20} J$. Les équations des courbes et les énergies correspondantes sont précisées sur chaque graphique.

En traitant de cette façon les données, il n'est pas possible d'obtenir une estimation de l'erreur commise sur E_{A}. En effet, il faut avoir plusieurs valeurs de E_{A}, provenant de plusieurs ajustements des données, pour obtenir un écart-type de ces valeurs.

Pour chaque concentration, les données des trois expériences ont donc également été ajustées indépendamment. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 5.2. Ces valeurs correspondent à la valeur moyenne des trois énergies d'activation obtenues par ajustement des données de chaque expérience. Les écarts-types sont estimés à partir de ces trois différentes énergies d'activation. Les erreurs sur la moyenne sont calculées en divisant l'écart-type par la racine du nombre d'expériences indépendantes effectuées - ici trois.

Concentration en lipides (mM)	Énergie d'activation ($k_B T$)
6	$30,8 \pm 0,8\, k_B T$
12	$29,8 \pm 2,7\, k_B T$
18	$30,4 \pm 1,6\, k_B T$

FIGURE 5.2 – Énergies d'activation de la fusion mesurées à différentes concentrations en lipides.

On constate que l'énergie d'activation est constante sur la gamme de concentration étudiée (de 6 mM à 18 mM). Il est donc possible de travailler avec l'une ou l'autre des

2. Le protocole précis a été décrit dans le Chapitre 4.

3. Étant donné que l'ensemble des expériences aux différentes températures sont réalisées sur deux jours, la première expérience est refaite dans les mêmes conditions en fin de manipulation, pour s'assurer que les l'état des liposomes n'a pas significativement changé sur cette période de temps.

concentrations de cette gamme. Nous avons donc choisi de travailler à 18 mM, pour avoir les signaux les plus importants possible.

2 Détermination de la taille des vésicules

L'énergie d'activation de la fusion de vésicules peut dépendre de leur courbure [86, 87], c'est-à-dire de leur taille, et il est donc important que ce paramètre soit fixé et connu.

Afin d'obtenir la population la plus monodisperse possible, les vésicules ont été extrudées à travers des membranes dont les pores mesuraient 50 nanomètres (cf Annexe A). La distribution de leur tailles a été étudiée grâce à deux techniques : la diffusion de lumière et la cryo-microscopie électronique.

2 .1 Mesure par diffusion de lumière

La diffusion de lumière (DLS), ou *Dynamic Light Scattering* en anglais, est une technique permettant d'accéder à la taille de particules colloïdales. Son principe est détaillé dans l'Annexe E.

Les deux populations de vésicules (fluorescentes et non marquées) sont passées à la DLS avant de faire les tests de mélange de lipides. La mesure est faite à 90°, à température ambiante, avec un laser à 632,8 nm. Les résultats sont présentés dans la Figure 5.3.

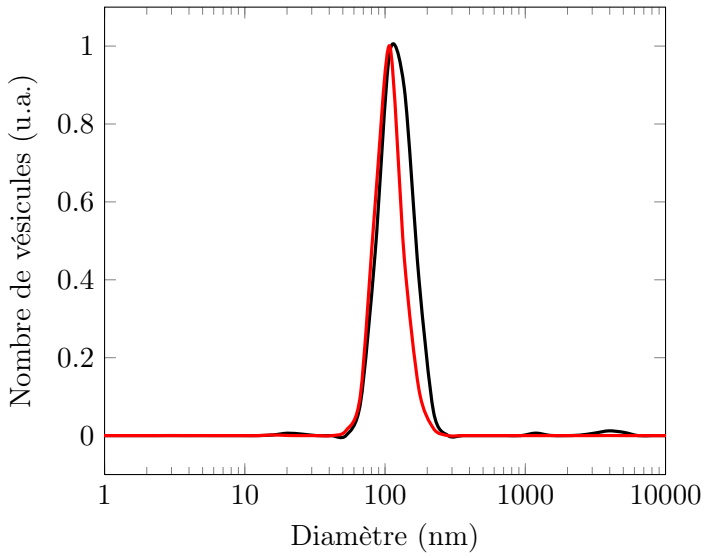


FIGURE 5.3 – **Distributions de tailles des vésicules de POPC obtenues par DLS**. Les distributions sont obtenues grâce à des mesures de DLS pour un angle de 90°. La courbe noire correspond aux liposomes non marqués et la courbe rouge, aux liposomes fluorescents.

On constate tout d'abord que les deux distributions sont relativement étroites. On considère donc que les liposomes ont globalement tous la même taille. De plus, les distributions de tailles des deux échantillons (fluorescents et non fluorescents) sont à peu près

semblables et le diamètre moyen obtenu vaut, dans les deux cas, environ 110 nanomètres.

2 .2 Mesure par microscopie électronique

Nous avons également réalisé des clichés de microscopie électronique du mélange des deux types de vésicules, avant de faire le test de mélange de lipides. Les tailles de 250 vésicules ont été recensées. Un histogramme récapitulant l'ensemble de ces valeurs est représenté en Figure 5.4.

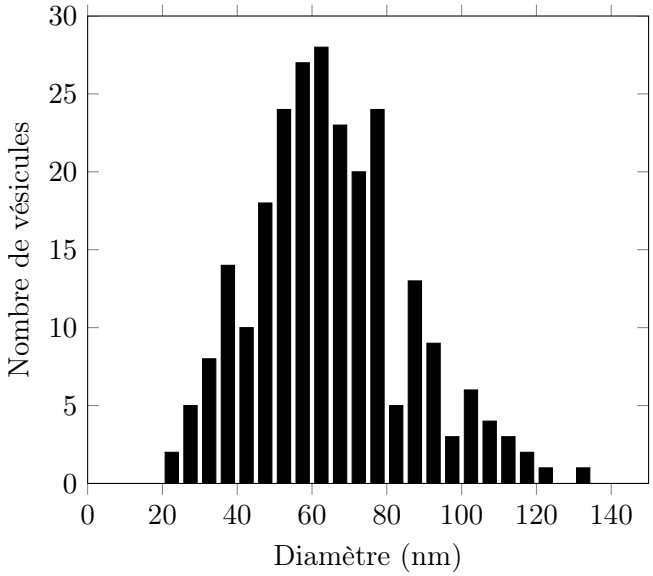


FIGURE 5.4 – **Distribution de tailles de 250 vésicules de POPC obtenues à partir de clichés de microscopie électronique**. L'échantillon comprend à la fois les vésicules non marquées et les vésicules fluorescentes (avec un rapport de sept pour une).

On constate tout d'abord que la distribution de tailles est relativement étroite, ce qui confirme la monodispersité obtenue par la mesure de DLS.

En revanche, on obtient un diamètre moyen de 65 nm, ce qui est nettement inférieur à la valeur obtenue grâce aux mesures de DLS.

La différence entre les résultats obtenus grâce à la DLS et à partir des clichés de microscopie électronique est saisissante.

Dans la cryo-microscopie électronique, la rapidité de la congélation tend à faire penser que les objets ne sont pas déformés. La taille mesurée est donc censée être proche de la taille réelle des liposomes. À l'inverse, la DLS mesure en réalité la taille hydrodynamique d'un objet, c'est-à-dire la taille d'un objet sphérique qui diffuserait à la même vitesse que celui-ci. Cette taille est souvent plus grande que la taille réelle des objets. Néanmoins, cela ne suffit pas à expliquer l'écart obtenu entre les deux mesures.

Il faut aussi prendre en compte que la DLS surestime la proportion de gros objets (car ceux-ci diffusent plus de lumière que les petits), objets qui ont par ailleurs sûrement été sous-estimés lors de la comptabilisation de seulement 250 objets sur les clichés de

microscopie électronique. De ce point de vue, l'une et l'autre des techniques ont un biais, à partir du moment où la distribution n'est pas parfaitement monodisperse.

Un point fort de la DLS est de faire une mesure moyenne, sur une quantité bien plus grande de vésicules, et non « choisies » par l'expérimentateur les mesurant une par une. Elle possède, en revanche, un inconvénient majeur que ne possède pas la microscopie électronique : selon l'angle de mesure, différentes tailles sont surestimées. Dans le cas d'une distribution qui n'est pas parfaitement monodisperse, ce qui est notre cas, une mesure prenant en compte plusieurs angles donne une meilleure estimation du rayon moyen des vésicules. En revanche, elle ne permet pas d'obtenir de distribution des tailles. Nous avons tout de même fait cette mesure, et avons obtenu un rayon moyen de l'ordre de 80 nm, ce qui est plus proche des résultats obtenus à partir de la microscopie électronique, et plus en accord avec le fait que les liposomes aient été extrudés à travers des membranes dont les pores font 50 nm.

Pour conclure, les liposomes semblent plutôt monodisperses. La valeur précise des tailles est plus difficile à obtenir mais elle doit être de l'ordre de 80 nm (entre les résultats de la DLS à 90° et de la microscopie, et proche de l'estimation donnée par la DLS à plusieurs angles). Les liposomes sont donc relativement petits à l'échelle des lipides, et leur courbure doit être prise en compte.

Une fois la taille des liposomes connue (80 ± 20 nm), il est possible d'avoir une idée de la distance séparant les vésicules en fonction de la concentration en lipides, et donc d'estimer si la concentration choisie permet bien aux vésicules d'être suffisamment diluées.

La distance moyenne entre les centres de deux vésicules D varie comme $(1/C)^{\frac{1}{3}}$, avec C, la concentration en vésicules, reliée à la concentration en lipides C_L (qui vaut 18 mM, dans notre cas) par $C_L = n\ C$, avec n, le nombre de lipides par vésicule.

On sait aussi que $n = \frac{2 \times 4\pi\ R^2}{a}$, avec R le rayon des liposomes (ici 40 nm) et a, l'aire occupée par un lipide (prise égale à 0,65 nanomètres carrés par lipide), les vésicules présentant deux monocouches de lipides.

On obtient alors $D = \frac{8\pi\ R^2}{a\ C_L}^{\frac{1}{3}} = 180$ nm, et une distance séparant les liposomes de $D - 2\ R = 100$ nm.

Ainsi, lorsque la concentration en lipides vaut 18 mM, des liposomes de 80 nanomètres de diamètre sont espacés de 100 nanomètres l'un de l'autre, soit un peu plus que leur taille. Cette distance est très petite et on imagine donc que nous n'aurions pas pu beaucoup accroître la concentration de travail, tout en restant dans un cas de solution diluée.

3 Caractérisation du type de mélange de lipides

Dans cette étude, la fusion est étudiée en détectant un mélange de lipides survenant entre vésicules. Or, la fusion n'est pas le seul processus entraînant un partage de lipides. L'hémifusion, où les monocouches externes des membranes fusionnent, en est un exemple

(cf Chapitre 2). D'autres types d'échange de lipides, lors de collisions ou bien à travers le solvant sous forme de monomères, de micelles ou d'agrégats de différents types, peuvent également avoir lieu [90, 91, 92, 93]. Il convient donc de vérifier la nature du processus étudié.

Ce travail vise à mesurer l'énergie d'activation effective de la fusion globale. Cette dernière comprend éventuellement des sous-étapes mais celles-ci ne sont pas étudiées ici. À titre d'exemple, l'hémifusion peut survenir sur le chemin de la fusion, comme état transitoire et ne pas s'inscrire, dans ce cas, dans le cadre de notre étude. En revanche, si l'hémifusion s'avère être l'état final du système, l'énergie mesurée correspond donc en fait à l'énergie d'activation de l'hémifusion, et il est capital de le déterminer.

Il s'agit alors d'analyser l'état final de notre système, pour voir s'il contient des vésicules ayant hémifusionné, complètement fusionné ou bien ayant juste échangé des lipides entre elles.

Notre étude porte sur l'énergie d'activation de la fusion de vésicules lipidiques à 37°C. Pour la mesurer, la température de l'échantillon est modifiée de façon à évaluer l'impact d'une énergie thermique croissante sur la probabilité de fusion. La gamme de température balayée est donc centrée et assez étroite [4] autour de 37°C.

En revanche, pour analyser l'état final du système après fusion, et donc déduire de quel processus relève l'énergie d'activation que nous mesurons, il n'est pas nécessaire de faire varier la température. Nous nous focaliserons donc uniquement sur la quantification de la proportion de vraie fusion ayant lieu pendant l'expérience à 37°C. On part de l'hypothèse que le mode de mélange de lipides ne change pas sur notre gamme de température et donc que l'unique effet de la température est de changer la cinétique du processus qui survient à 37°C.

Pour mettre en évidence la fusion complète et écarter la possibilité de détecter des événements d'hémifusion ou d'autres types de transferts de lipides, plusieurs techniques sont à notre disposition.

Le traitement des vésicules lipidiques fluorescentes par du dithionite de sodium permet de distinguer le partage des lipides du feuillet interne de celui du feuillet externe, ce qui limite les événements observés à ceux de fusion complète.

Pour mettre en évidence l'hémifusion, l'observation en microscopie électronique permet d'observer directement les liposomes en fin d'expérience, pour voir d'éventuelles structures bloquées en hémifusion.

3 .1 Mise en évidence de la fusion complète

Le partage des lipides du feuillet interne n'intervenant théoriquement qu'en cas de fusion totale, il permet de mettre en évidence des événements de fusion complète.

4. En effet, l'énergie d'activation de la fusion peut changer avec la température, puisque l'état de la membrane varie. On suppose que, sur notre gamme de température (27°C - 47°C), son éventuelle variation est plus faible que l'erreur sur la mesure. Nous discuterons ce point plus en profondeur dans l'Annexe C.

Le dithionite de sodium détruit la fluorescence du NBD et n'a théoriquement pas la capacité de traverser les membranes. Suivre le mélange de lipides entre des vésicules non marquées et des vésicules fluorescentes préalablement traitées avec du dithionite revient à observer uniquement le partage des lipides du feuillet interne, et donc à se focaliser sur la fusion totale.

3 .1.1 Matériel et méthodes

Le dithionite de sodium est acheté sous forme de poudre chez Sigma Aldrich (# 71699).

En solution, le dithionite est très instable et se détériore très facilement, en particulier avec la température. La solution de dithionite est donc préparée juste avant l'expérience, congelée directement dans de l'azote liquide, et décongelée uniquement au moment du traitement des liposomes.

$50\,\mu L$ de liposomes fluorescents (1,5% de lipides NBD et 1,5% de lipides Rhodamine) à 18 mM en lipides sont traités avec $1\,\mu L$ de dithionite à 1 M. Ce traitement est réalisé dans un puits d'une microplaque, permettant de suivre l'évolution de l'intensité de fluorescence du NBD résultant de l'ajout du dithionite à l'échantillon.

Pour vérifier si de la fusion complète survient dans notre étude, une expérience classique de test de mélange de lipides est menée, sauf que, dans ce cas, les liposomes traités au dithionite remplacent les vésicules fluorescentes classiques.

Le rapport entre la quantité de vésicules marquées et non marquées reste inchangé par rapport à l'expérience habituelle : $7\,\mu L$ de vésicules fluorescentes traitées au dithionite (toujours à 18 mM en lipides) sont mélangés dans un puits d'une microplaque avec $49\,\mu L$ de vésicules non fluorescentes (18 mM en lipides). Le test de fusion doit être réalisé juste après le traitement au dithionite. En effet, les lipides peuvent être échangés par flip-flop [5] entre les deux feuillets, et l'asymétrie créée par le traitement au dithionite n'est pas éternelle.

Un test classique est mené en parallèle, avec des liposomes fluorescents non traités au dithionite.

L'intensité de fluorescence du NBD (pour une excitation à 460 nm et émission à 538 nm) est suivie au cours du temps, dans le lecteur de plaques thermalisé à 37°C. Après 1h30, $50\,\mu L$ de Triton 4% ($4\,\mu L$ de Triton pour $96\,\mu L$ d'eau) sont ajoutés à l'échantillon pour solubiliser les lipides constituant les liposomes, écarter au maximum les sondes lumineuses, et pouvoir normaliser les données.

3 .1.2 Observation d'un partage des lipides du feuillet interne

La Figure 5.5 représente la variation de l'intensité de fluorescence mesurée par le lecteur de plaques à la suite de l'ajout du dithionite dans les liposomes fluorescents. On remarque que l'intensité de fluorescence de la solution traitée au dithionite de sodium est pratique-

5. Le temps caractéristique de flip-flop est compris entre quelques heures et la journée [9].

ment divisée par deux. Cela va dans le sens d'une destruction des fluorophores d'un feuillet seulement.

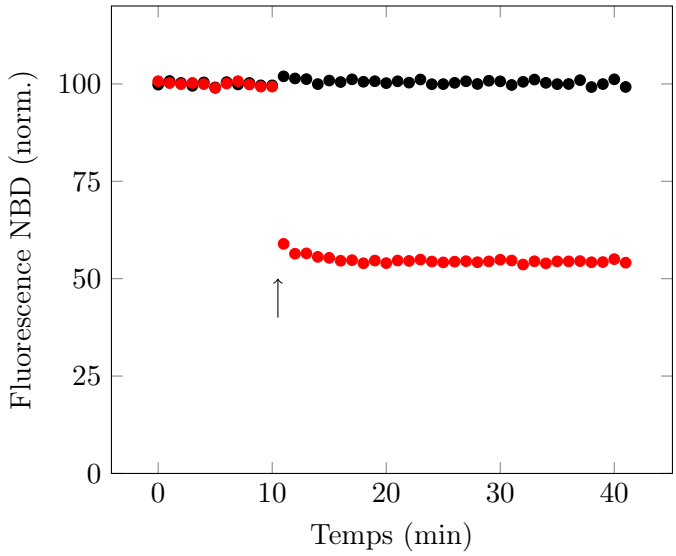


FIGURE 5.5 – **Traitement des vésicules fluorescentes par le dithionite à 37°C**. L'intensité de fluorescence avant l'ajout de dithionite est fixée à 100. Elle est à peu près divisée par 2 après l'ajout du dithionite (indiqué par la flèche noire). L'intensité de fluorescence d'une population contrôle, non traitée par le dithionite, mais à laquelle a été ajouté un même volume de solution tampon, est représentée en noir.

Deux tests de mélange de lipides ont ensuite été menés en parallèle, pour les vésicules fluorescentes traitées ou non au dithionite. Les données brutes du test avec les liposomes traitées au dithionite sont présentées dans la Figure 5.6.

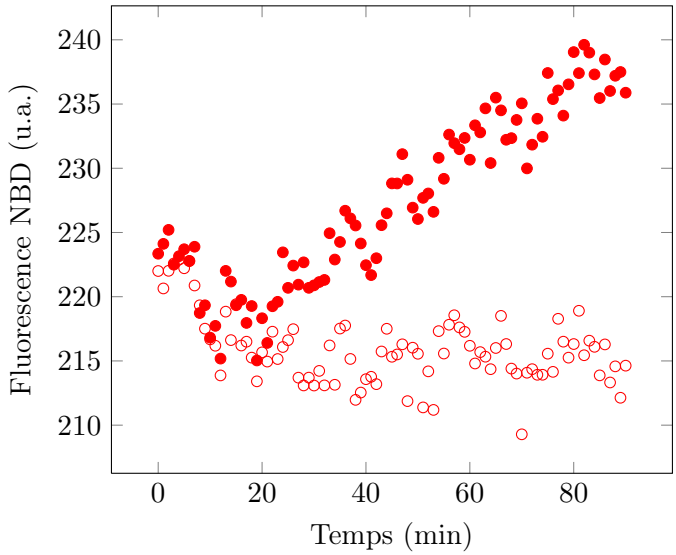


FIGURE 5.6 – **Mélange des lipides du feuillet interne seulement**. Les marqueurs pleins représentent le signal du NBD résultant du mélange de lipides des feuillets internes accompagnant la fusion. Les marqueurs vides correspondent au contrôle, où tous les liposomes sont fluorescents et marqués uniquement sur le feuillet interne.

On constate, tout d'abord, que l'intensité de fluorescence du NBD augmente dans l'échantillon traité au dithionite. Si ce signal résulte bien du mélange des lipides des feuillets internes, il s'agit forcément de fusion complète.

Il est donc nécessaire de s'assurer que, sur la gamme de temps de notre étude, aucun flip-flop significatif n'ait lieu. En effet, si l'asymétrie était perdue du fait du flip-flop, une augmentation du signal NBD pourrait provenir d'un mélange de lipides du feuillet externe.

On remarque que le signal du contrôle, ne contenant pas de vésicules non marquées, n'augmente pas (cf Figure 5.6), ce qui prouve l'absence de flip-flop. En effet, le simple fait, pour le NBD, de passer sur le feuillet externe suffirait à le diluer et à faire augmenter son signal. La piste du flip-flop étant écartée, elle annule en même temps la possibilité de détecter un partage de lipides d'un autre type. En effet, pour que des lipides NBD soient transférés entre vésicules sous forme de monomères, il faudrait, dans un premier temps, qu'ils passent sur le feuillet externe des vésicules, et ce par flip-flop, ce qui n'est manifestement pas le cas. Le signal obtenu dans cette expérience correspond donc à des événements de fusion complète.

La Figure 5.7 représente sur le même graphique les données normalisées des deux tests de fusion - mélange total des lipides et mélange des lipides du feuillet interne seulement, pour les échantillons respectivement non traité et traité au dithionite.

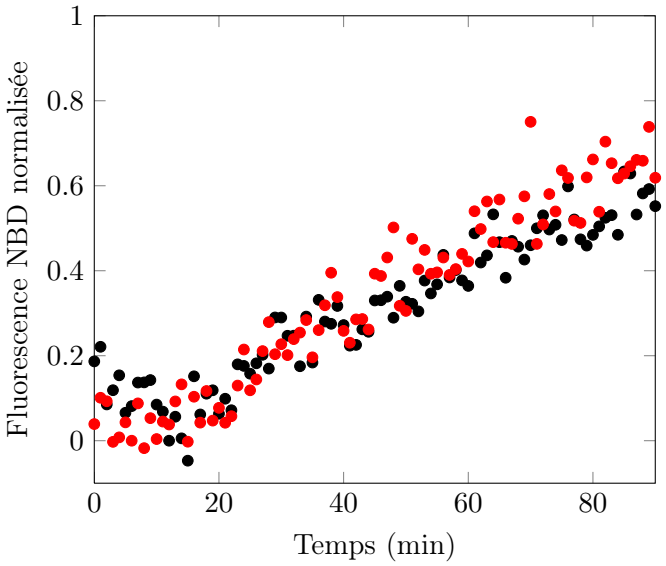


FIGURE 5.7 – **Mélange total des lipides ou du feuillet interne seulement**. La courbe rouge correspond au mélange de lipides des feuillets internes tandis que la courbe noire représente le mélange total des lipides. Les signaux NBD après ajout de détergent ont été fixés à 100. Cela signifie qu'environ 0,6% du signal maximum est atteint après 90 minutes dans les deux cas.

Les valeurs de fluorescence ayant été normalisées grâce à l'ajout de détergent [6], même

6. On rappelle que le traitement de données consiste à soustraire le signal du contrôle, puis à fixer à 100 la valeur du signal NBD atteinte après l'ajout du détergent, après l'avoir corrigée par les facteurs correctifs déterminés dans le Chapitre 4.

si l'intensité de fluorescence de l'échantillon ayant subi un traitement à la dithionite est initialement deux fois plus faible, les pentes sont théoriquement directement comparables. On remarque que les pentes sont globalement les mêmes. Cela va dans le sens d'un processus où tous les événements correspondraient à de la fusion complète.

L'ensemble de ces résultats montre que des événements de fusion complète surviennent dans notre échantillon et qu'ils représentent la grande majorité des événements de partage de lipides.

Pour confirmer ce résultat, nous avons fait de la cryo-microscopie électronique, pour étudier l'hémifusion, ayant décidé de nous focaliser sur cette dernière, les autres types de transferts de lipides ne nous paraissant pas primordiaux. En effet, il faudrait que leur cinétique soit extrêmement rapide pour que le signal en découlant soit comparable à un signal provenant de l'hémifusion ou de la fusion, qui engendrent d'un seul coup une dilution d'un facteur 2 ou 4 des lipides NBD. Or, les cinétiques de ce type d'échange sont lentes ; elles sont généralement étudiées sur plus de 12 heures [91, 92]. Comme elles ne sont pas censées changer avec la concentration [91, 92, 93], elles ne risquent même pas d'être accrues dans notre cas où les vésicules sont très concentrées. De plus, ces échanges semblent être favorisés par des différences dans les tailles des vésicules et dans les compositions de ces dernières [94], ce qui n'est pas notre cas.

Dans la suite, nous ne nous intéresserons donc plus à ce processus, mais nous focaliserons uniquement sur les processus de fusion et d'hémifusion, et tenterons de quantifier leurs proportions respectives.

3 .2 Quantification de la fraction de fusion complète

Contrairement à la microscopie optique, la microscopie électronique permet d'observer des objets de petite taille (inférieure à 200 nanomètres) et donc de voir directement les liposomes avec lesquels nous travaillons. Le principe est donc de regarder les liposomes en début et en fin de l'expérience de fusion à 37°C.

L'observation directe des objets avant et après l'expérience permet d'étudier leurs formes et leurs structures, et donc de potentiellement voir des diaphragmes d'hémifusion dans l'échantillon correspondant à la fin de l'expérience, donc éventuellement de mettre en évidence l'hémifusion comme état final.

De façon à quantifier le pourcentage d'hémifusion, il faut être capable d'estimer le nombre total d'événements de fusion (totale ou partielle) survenus pendant l'expérience. Le rapport entre le nombre de diaphragmes d'hémifusion observés et le nombre attendu d'événements donnera une estimation de la proportion d'hémifusion.

Nous présenterons, dans un premier temps, le protocole appliqué dans le but de quantifier le pourcentage de fusion complète.

Ensuite, nous détaillerons la façon dont nous avons estimé le nombre total d'événements de fusion (totale ou hémifusion).

Enfin, nous exposerons les résultats de la cryo-microscopie électronique et les hypothèses quant à la nature de la fusion survenant dans notre expérience en découlant.

3 .2.1 Matériel et méthodes

Le but étant de déterminer quel processus a eu lieu lors de l'expérience durant laquelle nous avons mesuré l'énergie d'activation du mélange de lipides, nous avons refait l'expérience à 37°C menée généralement pour cette mesure. Les liposomes ont été observés avant et après l'expérience.

Les deux types de liposomes (fluorescents et non fluorescents) sont mélangés dans la même proportion que pour un test classique de mélange de lipides ($7\,\mu L$ de vésicules fluorescentes pour $49\,\mu L$ de vésicules non marquées).

Une partie de ce mélange ($10\,\mu L$) est directement mise à l'écart, diluée six fois pour arriver à 3 mM en lipides, et conservée sous argon et à 4°C jusqu'à la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Cela correspond à l'échantillon « contrôle » dont l'étendue de l'échange de lipides est censée être faible.

$56\,\mu L$ de ce mélange sont disposés dans quatre différents puits d'une plaque pour lecteur de plaques. Trois des quatre puits servent à faire le test classique de mélange de lipides et à estimer le nombre d'événements de fusion tandis que le dernier sert à la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Le lecteur est thermalisé à 37°C et l'intensité de fluorescence du NBD est suivie au cours du temps.

Au bout de 1h30, $50\,\mu L$ de Triton 4% sont ajoutés dans les trois puits servant à quantifier le mélange de lipides. Le nombre total d'événements de fusion ou d'hémifusion peut être déduit du niveau atteint par le signal NBD en fin d'expérience.

Le contenu du dernier puits est sorti de la plaque, dilué six fois et conservé sous argon et à 4°C jusqu'à la préparation des grilles de microscopie électronique. Son observation permet d'analyser les structures des liposomes en fin d'expérience, et de déduire de quel type de fusion il s'agit.

Les grilles de microscopie électronique sont préparées quelques heures après la fin de l'expérience, pour les deux échantillons (début et fin d'expérience, qui ont été dilués et conservés à 4°C sous argon en attendant la congélation). Elles sont conservées congelées en attendant l'observation au microscope électronique (cf Annexe F pour une description de son principe).

Pour chaque échantillon, des images en champ large (grossissement 11500, 0,929 nm/pixel) sont d'abord réalisées pour observer un grand nombre de vésicules. Si deux vésicules sont collées, une image à plus fort grossissement (29000X, 0,368 nm/pixel) est acquise pour mieux discerner la structure et voir s'il s'agit de vésicules apposées ou hémifusionnées.

3 .2.2 Estimation du nombre d'événements

L'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence du NBD des trois premiers puits est représentée dans la Figure 5.8. Les données sont traitées comme il a été expliqué dans le Chapitre 4. Le contrôle a été soustrait, et les données ont été normalisées, grâce à l'ajout de détergent. Le signal maximal - valeur après ajout du détergent corrigée par le facteur correctif $\alpha_{\text{TRITON}}(37°\text{C})$ - a été fixé à 100.

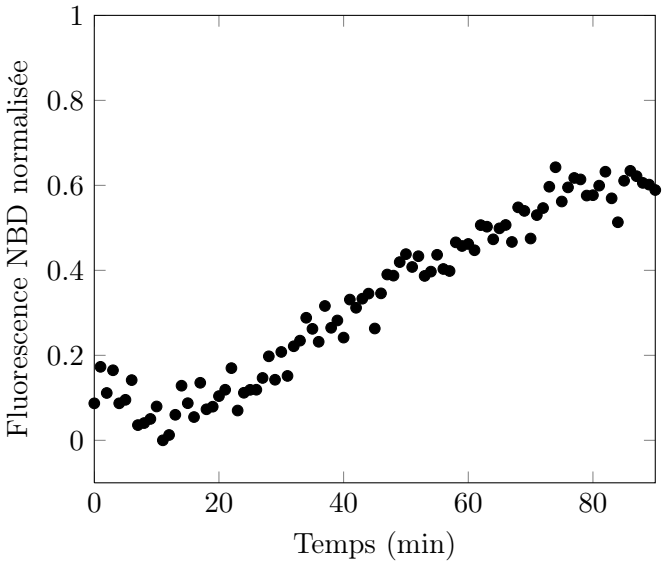


FIGURE 5.8 – **Mélange total des lipides**. Le signal NBD après ajout de détergent a été corrigé puis fixé à 100. L'augmentation du signal du NBD met en évidence un partage de lipides entre vésicules. La hauteur qu'il atteint en fin d'expérience (environ 0,6% du signal maximum) permet d'estimer le nombre d'événements de fusion (complète ou hémifusion) ayant eu lieu pendant l'expérience.

Dans le Chapitre 4, nous avons présenté comment l'intensité de fluorescence d'une molécule de NBD augmentait en fonction du pourcentage de lipides NBD et Rh dans les vésicules (cf Figure 4.5 du Chapitre 4).

Ces données nous permettent de remonter au pourcentage du signal maximal atteint en fonction du facteur de dilution par rapport à la situation initiale, et donc en fonction de l'avancée de la fusion [7], exprimée en nombre de cycles de fusion [8].

La Figure 5.9 représente le pourcentage du signal maximal du NBD atteint en fin d'expérience en fonction de l'état d'avancement de celle-ci (exprimé en cycles de fusion révolus, pour des liposomes de même taille).

Le signal NBD atteint 7,7% de sa valeur maximale après un cycle de fusion. En supposant que pour de faibles avancements du processus de fusion, l'évolution de l'augmentation du signal NBD avec le nombre de cycles de fusion soit linéaire, notre signal - 0,6% - corres-

7. Une étude de la sorte avait déjà été réalisée par Parlati *et al.* [95].

8. Un cycle de fusion correspond au cas où toutes les vésicules fluorescentes ont fusionné avec une vésicule non fluorescente. Cela correspond donc à une dilution double de la fluorescence.

pond à 0,08 cycles de fusion. On estime donc que 8% des vésicules de notre échantillon ont été impliquées dans un événement de fusion, ou 16% dans un événement d'hémifusion. En effet, un événement d'hémifusion entraîne une dilution deux fois moindre qu'un événement de fusion complète puisqu'elle ne dilue que les éléments du feuillet externe.

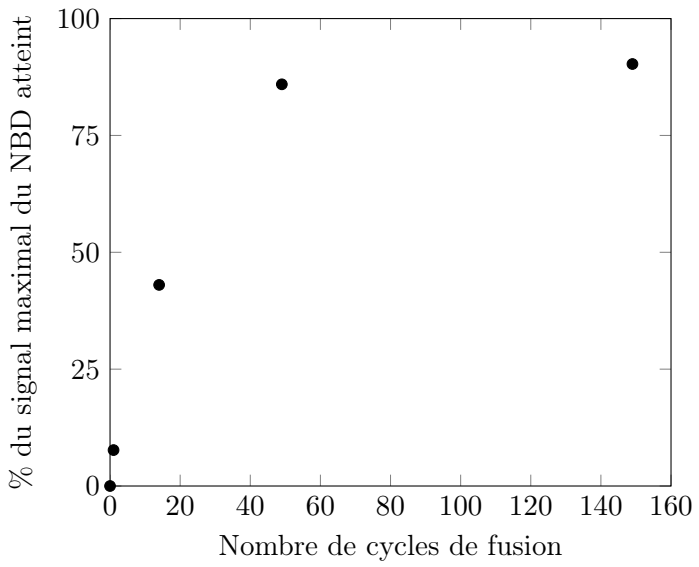


FIGURE 5.9 – **Pourcentage du signal maximal atteint en fin d'expérience en fonction du nombre de cycles de fusion accomplis**. Le signal NBD atteint 7,7% de sa valeur maximale après un cycle de fusion.

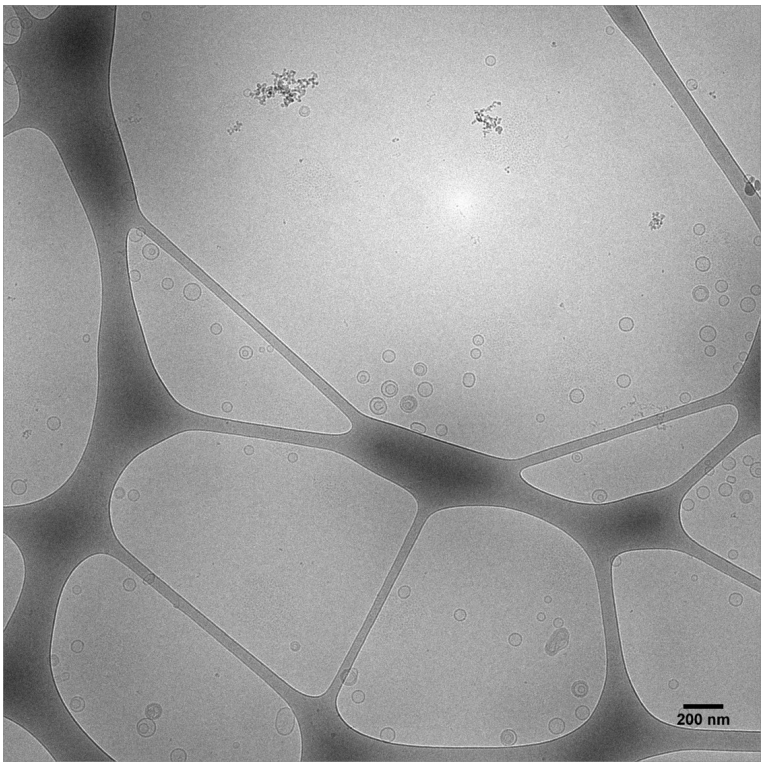
Si le phénomène étudié était composé à 100% d'événements d'hémifusion (ce qui n'est pas le cas car nous avons observé de la fusion complète avec l'expérience avec le dithionite), environ 16% des objets présenteraient un diaphragme d'hémifusion. En cas de fusion complète, à l'inverse, aucun diaphragme ne doit pouvoir être observé sur une grande population de vésicules.

3 .2.3 Observation des liposomes par cryo-microscopie électronique

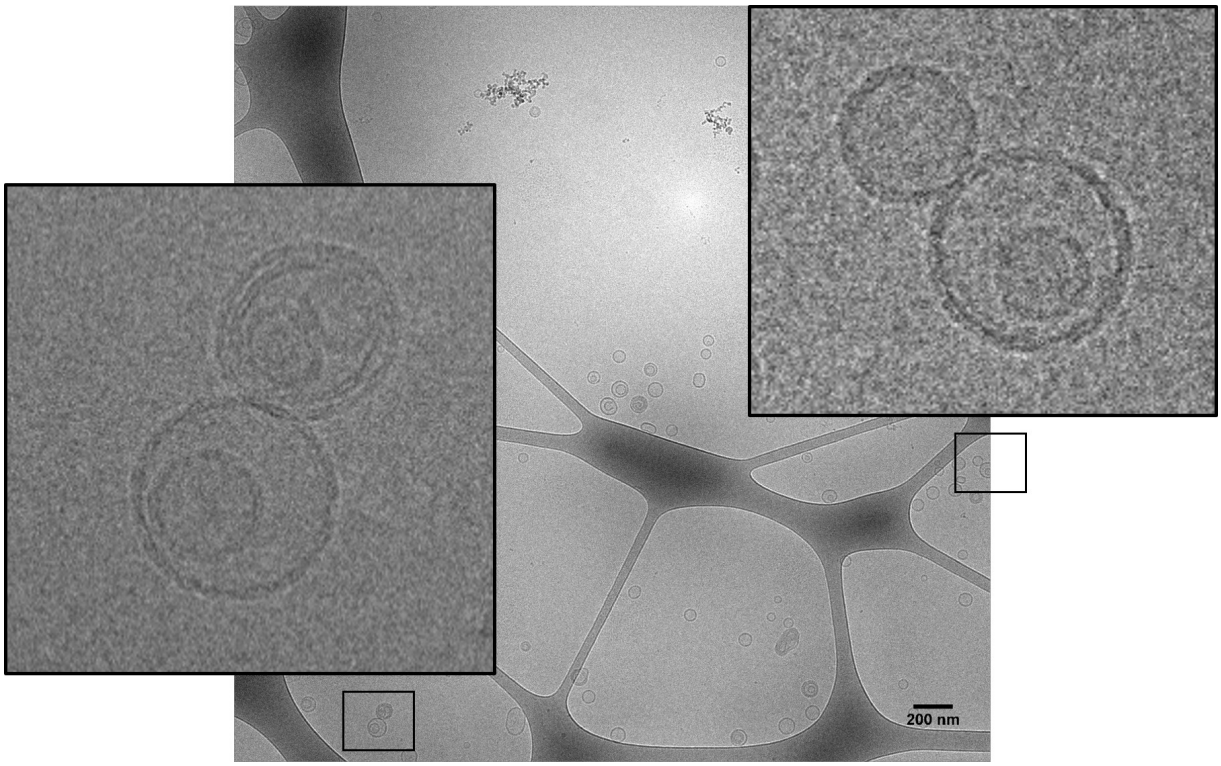
Diao *et al.* ont déjà observé en microscopie électronique de l'hémifusion étendue pour des vésicules de taille comparable à celle des nôtres [83] (cf Figure 3.8 du Chapitre 3). Si l'hémifusion étendue est suffisamment stable, elle est donc observable en microscopie électronique. C'est donc ce type de structure que nous recherchons dans nos clichés.

Un total de 4215 vésicules ont été imagées en champ large et des images à plus fort grossissement ont été réalisées lorsque deux vésicules étaient collées (cf Figure 5.10). Sur tous les zooms, aucun diaphragme d'hémifusion n'a pu être observé.

Pourtant, lors d'une autre expérience avec une autre composition lipidique, et que nous présenterons dans le prochain chapitre, nous avons observé une structure (cf Figure 5.11) ressemblant au diaphragme d'hémifusion de Diao *et al.* (cf Figure 3.8 du Chapitre 3).



(a) Vésicules de POPC incubées 1h30 à 37°C et observées à un grossissement 11500 en cryo-microscopie électronique.



(b) Vésicules de POPC incubées 1h30 à 37°C, collées entre elles et observées à un grossissement 29000 en cryo-microscopie électronique. Dans ce cas, elles sont uniquement apposées, et pas hémi-fusionnées.

FIGURE 5.10 – **Analyse des images de cryo-microscopie électronique**. Des champs proches sont pris lorsque deux vésicules sont apposées. La meilleure résolution permet, en général, de distinguer hémifusion et apposition des vésicules.

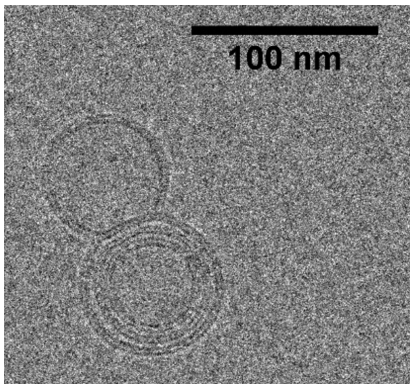


FIGURE 5.11 – **Diaphragme d'hémifusion**. Vésicules de DOPC-DOPE(75:25) incubées 1h30 à 37°C et observées à un grossissement 500000 en cryo-microscopie électronique.

La vésicule du bas n'est pas unilamellaire mais l'épaisseur du diaphragme est comparable à celle des bicouches délimitant les vésicules. Cette structure est nettement différente de celles correspondant à deux vésicules apposées et qui sont présentées dans la Figure 5.10b. Cela montre que nous sommes capables de visualiser de l'hémifusion étendue. S'il y avait de l'hémifusion étendue systématique, nous la verrions donc.

Sachant que nous attendons environ 8% d'événements de fusion, ou 16% d'hémifusion, ou des proportions intermédiaires d'une combinaison de ces deux processus, et que nous avons observé 4215 vésicules, il y a potentiellement 674 vésicules bloquées en hémifusion si le signal de fluorescence obtenu lors de l'incubation à 37°C correspond uniquement à des événements d'hémifusion étendues et stables. Étant donné que nous n'avons observé aucun diaphragme, nous estimons le pourcentage d'hémifusion à maximum 0,15%, ce qui correspond à moins de un diaphragme sur les 674 potentiellement attendus.

Il s'agit de statistiques à partir de statistiques donc ce nombre n'est évidemment pas exact. De plus, il se peut que certains événements d'hémifusion soient plus localisés et plus difficiles à observer. Néanmoins, ces résultats confirment les résultats obtenus avec le dithionite, et vont dans le sens d'un processus de fusion complète.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il y a des événements de fusion, et que, parmi l'ensemble des événements permettant un partage de lipides (fusion totale, hémifusion ou autre type de transfert de lipides), les événements de fusion totale sont les plus représentés.

L'énergie d'activation mesurée en suivant le mélange de lipides entre vésicules à différentes températures doit donc donner une bonne estimation de l'énergie d'activation de la fusion de vésicules lipidiques.

4 Estimation de l'énergie d'activation

Une fois la concentration de travail choisie, la taille moyenne des liposomes a été déterminée et le type de processus caractérisé. Afin de s'assurer que notre protocole était

robuste et qu'il permettait de mesurer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de vésicules d'une taille donnée de façon reproductible, nous avons réalisé la mesure d'énergie d'activation de la fusion de vésicules de POPC six fois supplémentaires.

La Figure 5.12 donne les résultats finaux de notre mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de vésicules de POPC. Les données reportées sur le graphique correspondent aux données moyennes des neuf expériences mais l'énergie d'activation qui y est inscrite correspond à la moyenne des neuf énergies déterminées par ajustement indépendant des données de chaque expérience, de façon à avoir une idée de l'erreur sur la mesure. On obtient $E_{\mathrm{A}} = 30,7 \pm 1,1\, k_B T$.

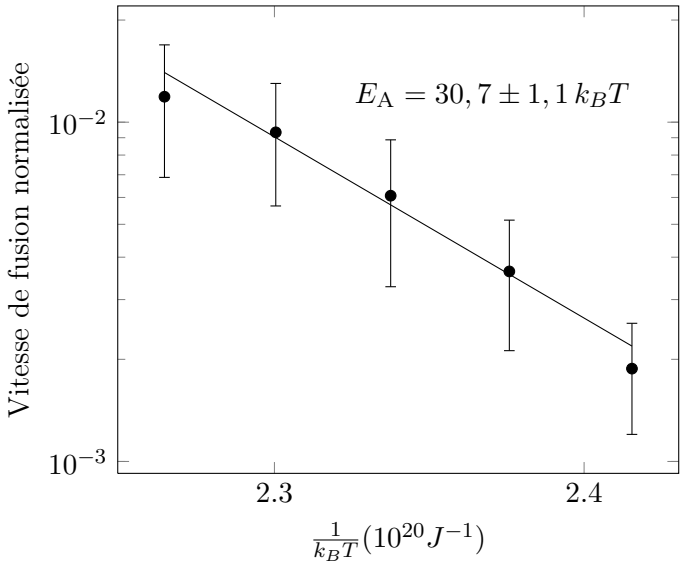


FIGURE 5.12 – **Énergie d'activation de la fusion de vésicules de POPC**.

On remarque, tout d'abord, que les six mesures supplémentaires ne changent pas beaucoup l'estimation de l'énergie d'activation obtenue grâce aux trois premières expériences - la première estimation était de $30,4 \pm 1,6\, k_B T$. Dans ces conditions, et pour de tels écarts-types, on considère donc que trois mesures indépendantes sont suffisantes pour obtenir une bonne estimation de E_{A}.

Plusieurs arguments laissent à penser que l'estimation de l'énergie d'activation que nous avons obtenue est raisonnable.

Tout d'abord, les SNAREs, acteurs principaux de la machinerie protéique responsable de la fusion *in vivo* sont capables de fournir une telle énergie. En effet, l'assemblage partiel du complexe SNARE libère une énergie de l'ordre de $35\, k_B T$ [96].

De plus, notre mesure expérimentale est en accord avec les estimations théoriques et numériques trouvées dans la littérature, qui prévoient une énergie comprise entre $20\, k_B T$ et $150\, k_B T$ [22, 23, 24, 30, 31, 32]. Notre estimation se situe en bas de la fourchette regroupant les différentes prévisions théoriques et les résultats des simulations numériques. Comme nous l'avons discuté dans le Chapitre 2, il est difficile de pouvoir comparer ces études entre elles et de se situer par rapport à elles. Néanmoins, $150\, k_B T$ paraissent très

difficilement surmontables spontanément. À l'inverse, une énergie de $20\,k_BT$ semble un peu faible pour prévenir une fusion spontanée anarchique. En effet, il a été montré que l'énergie fournie à un système pendant une seconde par les fluctuations thermiques était de l'ordre de $40\,k_BT$ [40] et que, de ce fait, si l'énergie requise par un processus était supérieure à cette valeur, le recours à l'intervention des protéines était nécessaire. *A fortiori*, un processus exigeant un apport d'énergie moindre pouvait se dérouler spontanément à ces échelles de temps.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre tendent à montrer que nous avons réussi à mettre au point un protocole permettant de mesurer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de vésicules purement lipidiques de composition lipidique et de taille données.

La suite de notre étude a donc consisté à varier la composition lipidique de ces vésicules, pour mesurer l'énergie d'activation de la fusion de vésicules de complexité croissante. Pour toutes les autres compositions lipidiques, la mesure a été réalisée trois fois.

Chapitre 6

Étude énergétique de la fusion de systèmes plus complexes

Nous avons montré, à l'aide d'un système très simple, que nous étions parvenus à mettre au point un protocole permettant de déterminer expérimentalement l'énergie d'activation de la fusion de bicouches purement lipidiques. Nous avons alors voulu l'utiliser pour étudier d'autres systèmes, présentant des compositions lipidiques différentes.

Nous nous sommes, tout d'abord, intéressés au cas de la fusion de bicouches de DOPC, un lipide souvent utilisé à la place du POPC, du fait de leurs similitudes. Leurs comportements vis à vis de la fusion se sont, en réalité, avérés notablement différents.

Ce résultat a prouvé, entre autres, que notre protocole permettait bien d'obtenir des résultats différents en fonction de la composition lipidique, ce qui était un argument en faveur de sa pertinence. L'étude systématique de l'impact de l'ajout d'une fraction donnée d'un lipide dans la membrane est donc possible.

Nous présenterons, dans un premier temps, les résultats concernant la fusion de bicouches de DOPC, et les comparerons à ceux obtenus pour des membranes de POPC.

Ensuite, nous exposerons les résultats obtenus pour des membranes de POPC ou de DOPC contenant des fractions croissantes de lipides dits *fusogènes*, du fait de leur courbure spontanée négative.

1 Fusion de membranes composées de lipides cylindriques

Tout d'abord, nous nous sommes penchés sur le cas du DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, ou 18:1-18:1 PC). Ce lipide possède la même tête polaire (PC) que le POPC mais, au lieu d'avoir une queue 16:0 et une queue 18:1, il possède deux fois la même queue 18:1 (cf Figure 6.1).

Du fait de la taille de leur tête polaire, ils adoptent tous deux une géométrie relativement cylindrique. En raison de leurs caractéristiques similaires (nature de la tête et géométrie), ils sont souvent considérés comme possédant des propriétés proches. C'est dans ce cadre que nous avons décidé de comparer leurs énergies d'activation de fusion respectives.

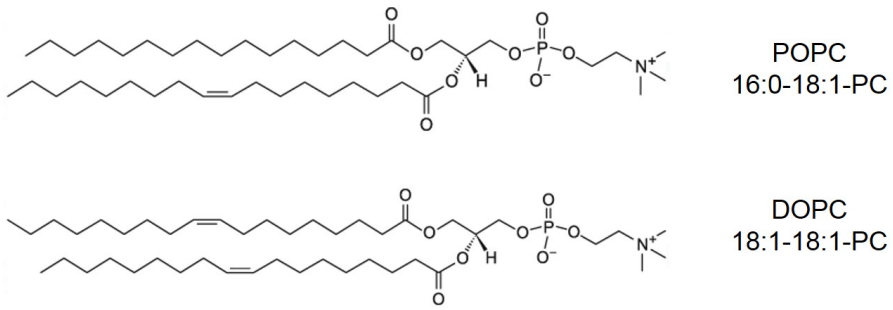


FIGURE 6.1 – **Représentations chimiques du DOPC et du POPC**. Le DOPC possède deux chaînes insaturées (18:1) tandis que l'une de ces chaînes est remplacée par une chaîne saturée (16:0) dans le cas du POPC. Ces deux lipides possèdent une tête choline (PC).

1 .1 Énergie d'activation du DOPC

Tout d'abord, la distribution de tailles des vésicules de DOPC a été mesurée à la DLS. Elle est représentée dans la Figure 6.2, avec celle des vésicules de POPC, afin de pouvoir les comparer. Dans les deux cas, les distributions présentées correspondent à la moyenne de celles obtenues pour les liposomes fluorescents et les liposomes non marqués.

On constate que les deux distributions de tailles sont comparables. En examinant les énergies d'activation de fusion de tels systèmes, nous nous focalisons donc bien sur l'impact de la composition des vésicules sur la fusion, et non sur celui de la courbure.

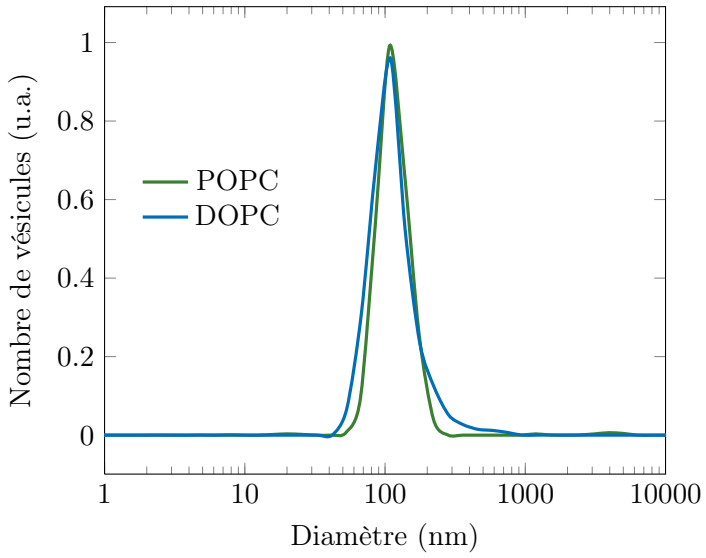


FIGURE 6.2 – **Distributions de tailles des vésicules de DOPC et de POPC**. Les distributions des tailles des vésicules fluorescentes et non marquées ont été moyennées. La distribution de tailles des vésicules de DOPC est semblable à celle obtenue pour les vésicules de POPC. Les énergies d'activation de fusion de ces deux systèmes sont donc comparables.

Grâce au protocole décrit dans le Chapitre 5, nous avons évalué l'énergie d'activation de la fusion de vésicules de DOPC, d'un diamètre de l'ordre de 80 nm, à $39,1 \pm 0,9\, k_B T$. Cette valeur est significativement différente de celle obtenue pour le POPC ($30,7 \pm 1,1\, k_B T$),

malgré les similitudes que présentent ces deux lipides.

1 .2 Comparaison de la fusion du DOPC et du POPC

Afin de pouvoir émettre une hypothèse sur la raison de l'écart résidant entre les énergies d'activation de fusion respectives du POPC et du DOPC, nous allons nous pencher sur les différences existant entre ces deux molécules.

Tout d'abord, le DOPC possède deux chaînes mono-insaturées et non une seule comme le POPC. Comme les insaturations introduisent des coudes dans les chaînes carbonées, ces dernières occupent un volume plus important dans le cas du DOPC. Cette différence de géométrie se retrouve dans les courbures spontanées de ces deux lipides : celle du DOPC ($-0,091 \pm 0,008$ nm^{-1}) est plus grande que celle du POPC ($-0,022 \pm 0,01$ nm^{-1}) [97]. Si ces deux molécules restent à peu près cylindriques, le DOPC s'avère légèrement plus conique que le POPC (cf Figure 6.3).

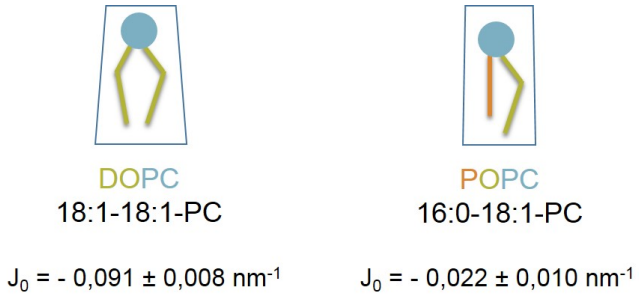


FIGURE 6.3 – **Représentations schématiques du DOPC et du POPC**. Les polygones encadrant les lipides sont uniquement indicatifs, pour avoir une idée de la géométrie des lipides. Les valeurs des courbures spontanées J_0 sont extraites de [97].

Un défaut hydrophobe est défini comme une zone où le premier atome rencontré en se rapprochant du centre de la bicouche perpendiculairement à celle-ci est un atome hydrophobe (cf Figure 6.4).

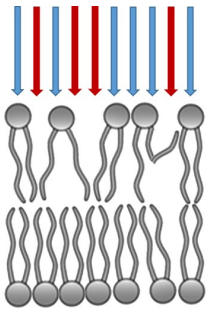


FIGURE 6.4 – **Défauts hydrophobes**. Les défauts hydrophobes sont indiqués par des flèches rouges. Ils consistent en des zones où le cœur hydrophobe de la bicouche est accessible à l'eau environnante.

Un lipide conique n'est pas adapté pour la configuration plane (ou légèrement courbée dans l'autre sens) des membranes (cf Figure 6.5) ; elle engendrerait une quantité considé-

rable de défauts hydrophobes. Le DOPC et le POPC présentent des courbures spontanées suffisamment faibles pour pouvoir former des membranes. Néanmoins, elles peuvent être suffisantes pour laisser apparaître de légers défauts hydrophobes à la surface de la membrane (cf Figure 6.5).

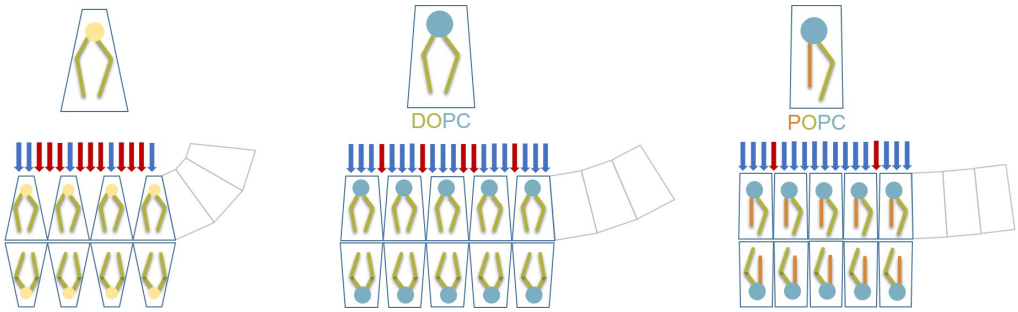


FIGURE 6.5 – **Défauts résultant d'une mauvaise adéquation entre courbures des lipides et de la membrane**. Les polygones encadrant les lipides sont uniquement indicatifs, pour avoir une idée de la géométrie des lipides. Les polygones gris montrent la configuration que tend à adopter chaque lipide, pour limiter les défauts. Les défauts hydrophobes sont indiqués par des flèches rouges. Ils sont tellement nombreux dans le cas des lipides coniques (figure de gauche) que ces derniers ne peuvent pas adopter de conformation lamellaire.

L'idée est donc de comparer les densités de défauts existant à la surface de membranes de POPC et de DOPC et de voir si elles sont significativement différentes, ce qui pourrait expliquer l'écart résidant entre leurs énergies d'activation de fusion.

Pour cela, nous avons collaboré avec des théoriciens (Patrick Fuchs et Amélie Bacle, de l'équipe *Dynamique des membranes et trafic intracellulaire* à l'Institut Jacques Monod) pour faire des simulations tous-atomes et modéliser des membranes afin d'étudier la densité de défauts hydrophobes existant en moyenne à leur surface. Les données en rouge dans la Figure 6.6 présentent la fraction de la surface de la membrane qui est occupée par des défauts hydrophobes, pour le POPC et le DOPC. On constate que celle-ci est plus importante dans le cas du DOPC, ce qui est en accord avec les géométries respectives de ces lipides, mais ne permet pas d'expliquer pourquoi l'énergie d'activation du DOPC est plus haute que celle du POPC.

La vitesse de fusion spontanée est décrite par la loi d'Arrhenius (cf Équation 3.5 du Chapitre 3). L'énergie d'activation a donc un impact sur la vitesse de fusion, mais le facteur pré-exponentiel est également déterminant.

Ce facteur inclut de nombreux paramètres. À titre d'exemple, la concentration des vésicules en fait partie, puisque la vitesse de fusion augmente avec les collisions et donc avec la concentration. Intuitivement, on aurait aussi tendance à envisager la densité de défauts comme étant un autre paramètre de ce facteur, pouvant ainsi promouvoir la fusion par cet intermédiaire.

La Figure 6.6 présente, en plus des résultats concernant les défauts membranaires, les pré-facteurs d'Arrhenius obtenus[1] dans le cas du DOPC et du POPC. On constate que

1. Les préfacteurs d'Arrhenius sont déterminés au même moment que l'énergie d'activation, à partir

ces derniers évoluent bien dans le même sens que la densité de défauts.

La présence accrue de défauts promeut donc bien la fusion, mais par l'intermédiaire du préfacteur d'Arrhenius. La propension de la fusion à être nucléée est donc intégrée dans le préfacteur d'Arrhenius.

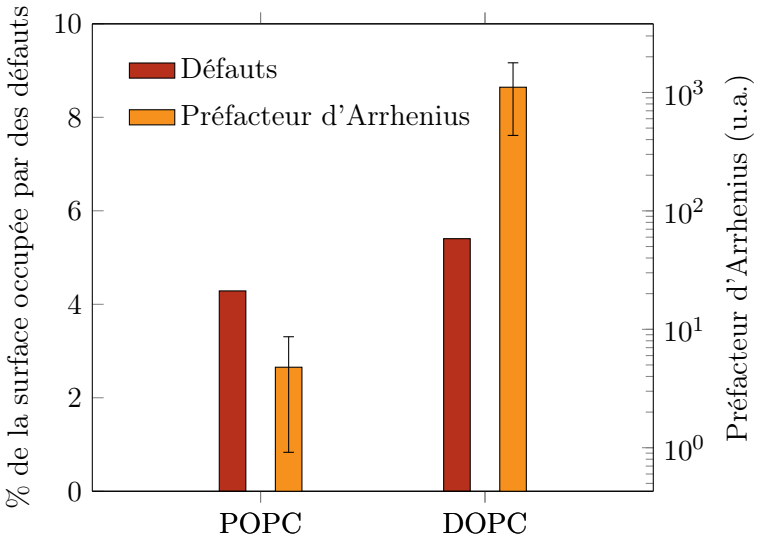


FIGURE 6.6 – **Corrélation entre la fraction de la surface occupée par des défauts hydrophobes et le préfacteur d'Arrhenius**. Les membranes de DOPC possèdent plus de défauts que les membranes de POPC et leur préfacteur d'Arrhenius est également plus élevé. *Résultats sur les défauts obtenus par Patrick Fuchs et Amélie Bacle.*

Ce ne sont donc *a priori* pas les géométries respectives du DOPC et du POPC qui peuvent expliquer les différences résidant dans leurs énergies d'activation de fusion. Cependant, à ce niveau de l'étude, nous n'avons malheureusement pas d'idée de ce qui peut être à l'origine de cette différence.

2 Influence des lipides à courbure négative sur la fusion

Nous avons ensuite décidé de nous intéresser aux conséquences de l'ajout de lipides supposés fusogènes à nos membranes.

Les lipides dont l'alcool qui a été fixé sur le groupement phosphate est un groupement ethanolamine (PE) ont généralement une forme fortement conique, étant donnée la petite taille de la tête polaire résultante. Ils ne peuvent donc pas former de bicouches (cf Figure 6.5 de gauche).

Ils peuvent, en revanche, être incorporés dans des membranes plates, si leur fraction ne dépasse pas une certaine limite (dépendant en particulier de la température). Ils sont supposés être fusogènes, en cela qu'ils favorisent la transition d'une phase lamellaire vers une phase hexagonale inverse, phase qu'ils adopteraient s'ils étaient seuls (cf Figure 1.5 du Chapitre 1). Ils sont donc censés promouvoir la fusion [21, 98, 24, 40, 27] en favorisant la formation du *stalk*, l'intermédiaire hémifusionné présenté en 2 .4 du Chapitre 2 [55, 56, 34, 35, 57, 20].

des ajustements exponentiels des vitesses de fusion spontanée en fonction de la température.

Nous avons décidé d'étudier l'impact de l'incorporation dans des membranes de DOPC ou de POPC, de fractions croissantes de DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamine ou 18:1-18:1 PE) ou de POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamine ou 16:0-18:1 PE) (cf Figure 6.7).

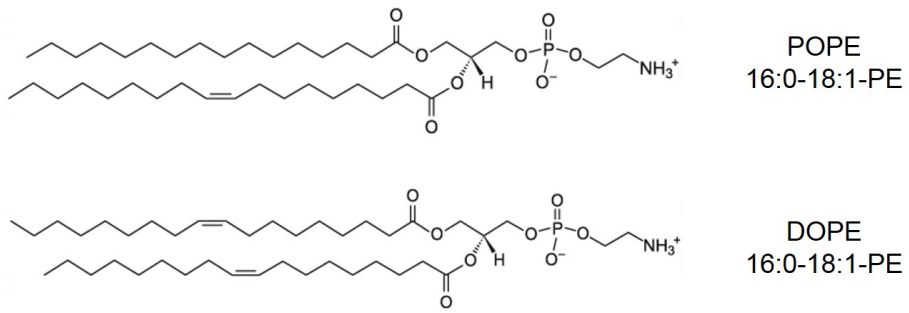


FIGURE 6.7 – **Représentations chimiques du DOPE et du POPE**. Ces lipides sont les analogues du DOPC et du POPC, mais ils possèdent une tête éthanolamine (PE) au lieu d'une tête choline (PC).

2 .1 Énergie d'activation de fusion de membranes contenant du PE

Dans un premier temps, nous avons incorporé 25% de DOPE ou de POPE dans des vésicules de DOPC ou de POPC. Les distributions de tailles sont représentées dans la Figure 6.8, avec celles des vésicules de DOPC et de POPC (déjà présentées dans la Figure 6.2). Les distributions sont, encore, toutes similaires, prouvant, de ce fait, que ce sont bien les effets du changement de composition lipidique que nous sondons. Les énergies d'activation de fusion correspondantes sont regroupées dans la Figure 6.9.

Tout d'abord, on constate que les ajouts de DOPE et de POPE ont le même effet sur l'énergie d'activation [2]. Nous aurions pourtant pu nous attendre à avoir un effet différent pour ces deux lipides étant donné que nous avons vu que le POPC et le DOPC n'avaient pas les mêmes propriétés en ce qui concernait la fusion. Ici, l'impact de la tête (PE) semble donc dominer sur celui des queues hydrophobes (deux insaturées *vs* une insaturée et une saturée).

Dans le cas des membranes de DOPC, l'ajout de 25% de PE n'a pas d'effet significatif. Dans le cas du POPC, en revanche, l'énergie d'activation augmente de façon significative en présence de 25% de PE.

Il n'est pas évident de comprendre pourquoi l'incorporation de PE a un effet sur les membranes de POPC et pas sur celles de DOPC. Nous avons donc décidé d'étudier la fusion de vésicules comportant 50% de DOPE [3], dans le but de mieux comprendre l'effet engendré par l'ajout de PE dans des membranes de POPC ou de DOPC.

2. Nous parlerons donc de PE pour commenter à la fois les résultats du DOPE et du POPE.
3. Nous avons uniquement travaillé avec du DOPE car le DOPE et le POPE ont des effets semblables.

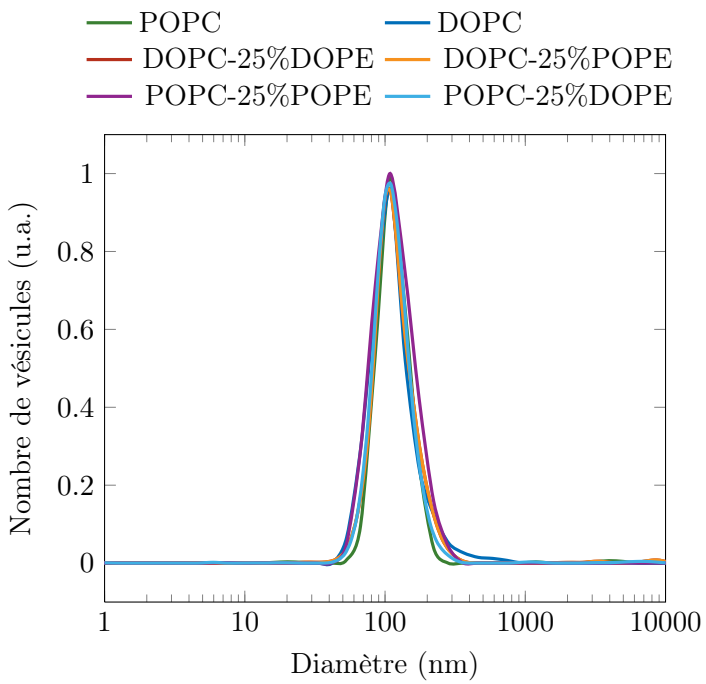


FIGURE 6.8 – **Distributions de tailles des vésicules composées de PC et de PE**. Les distributions des tailles des vésicules fluorescentes et non marquées ont été moyennées. Toutes les distributions de tailles sont semblables ; les énergies d'activation de fusion des différents systèmes sont donc comparables.

Composition	POPC	POPC-DOPE(75:25)	POPC-POPE(75:25)
E_{A} $(k_B T)$	$30,7 \pm 1,1$	$35,1 \pm 0,6$	$35,6 \pm 1,5$

Composition	DOPC	DOPC-DOPE(75:25)	DOPC-POPE(75:25)
E_{A} $(k_B T)$	$39,1 \pm 0,9$	$38,9 \pm 1,2$	$38,7 \pm 0,9$

FIGURE 6.9 – **Énergies d'activation de vésicules contenant 25% de PE**. L'effet du DOPE et du POPE semble être le même. L'ajout de 25% de DOPE ou de POPE n'a aucun impact sur l'énergie d'activation de la fusion de vésicules de DOPC mais augmente celle du POPC. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types de trois expériences indépendantes.

La Figure 6.10 représente les distributions de tailles obtenues pour les échantillons contenant 50% de DOPE. On constate qu'elles sont semblables à toutes les autres. En plus de montrer que les énergies d'activation sont comparables, cela prouve que des liposomes sont bien formés, même si la quantité de lipides non cylindriques est importante. Les énergies d'activation correspondantes sont regroupées dans la Figure 6.11. La tendance globale est que l'ajout de DOPE fait augmenter l'énergie d'activation de fusion du système. Dans la suite, nous allons tenter d'expliquer cette tendance, de prime abord étonnante, lorsque l'on sait que le DOPE est réputé fusogène.

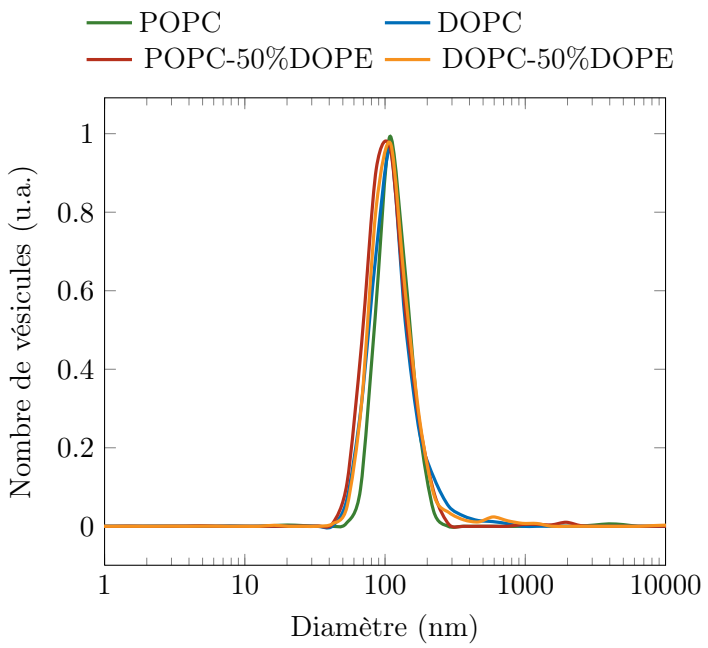


FIGURE 6.10 – **Distributions de tailles des vésicules comprenant 50% de DOPE**. Les distributions des tailles des vésicules fluorescentes et non marquées ont été moyennées. Toutes les distributions de tailles sont semblables ; les énergies d'activation de fusion des différents systèmes sont donc comparables.

Composition	DOPC-DOPE(50:50)	POPC-DOPE(50:50)
E_{A} ($k_B T$)	$52,4 \pm 1,5$	$43,5 \pm 2,4$

FIGURE 6.11 – **Énergies d'activation de vésicules contenant 50% de PE**. Dans le cas du POPC et du DOPC, l'ajout de 50% de DOPE fait augmenter l'énergie d'activation de la fusion. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types de trois expériences indépendantes.

2 .2 Étude de l'impact de l'ajout de PE sur la fusion

L'énergie que nous mesurons est celle du processus global de fusion, incluant éventuellement une étape d'hémifusion et une étape de finalisation de la fusion.

Or le DOPE est connu pour promouvoir l'hémifusion et inhiber l'ouverture d'un pore de fusion, donc la finalisation de la fusion, lorsqu'il est respectivement situé sur les feuillets externe et interne de la membrane. Le DOPE présent sur le feuillet externe de la membrane peut donc faire baisser l'énergie d'activation globale de sa fusion en abaissant la barrière énergétique à dépasser pour que les membranes hémifusionnent. Celui de la monocouche interne peut, quant à lui, la faire augmenter en faisant croître la barrière à surmonter pour qu'un pore soit ouvert.

Dans la suite, lorsque nous parlerons de capacité à promouvoir l'hémifusion, nous ferons référence au DOPE situé sur le feuillet externe tandis que lorsque nous nous référerons au pouvoir du DOPE à inhiber la fusion, il s'agira de lipides situés sur la monocouche interne. Ici, l'inhibition de la fusion semble dominer.

De nombreuses explications peuvent exister. Nous présenterons celles qui sont les plus intuitives et les résultats qui ont découlé des expériences réalisées pour les vérifier.

Hypothèse $\mathcal{H}_1$: La capacité du DOPE à inhiber la fusion l'emporte sur celle à promouvoir l'hémifusion.

Hypothèse $\mathcal{H}_2$: Le DOPE peut autant inhiber la fusion que promouvoir l'hémifusion mais c'est la finalisation de la fusion qui est l'étape limitante. Cela n'apporte donc rien que le DOPE facilite encore l'hémifusion - déjà « simple » - mais qu'il inhibe la fusion a un fort impact.

Hypothèse $\mathcal{H}_3$: Les deux étapes sont toutes deux difficiles et le DOPE inhibe la fusion autant qu'il promeut l'hémifusion mais une plus grande fraction du DOPE se situe sur le feuillet interne, du fait de sa courbure spontanée. La fusion est donc globalement plus inhibée que promue, de par les quantités respectives de DOPE présents sur chacun des feuillets.

La véracité de $\mathcal{H}_1$ est difficile à évaluer. Nous avons donc choisi de nous concentrer, dans un premier temps, sur $\mathcal{H}_2$. Si cette dernière est exacte, de nombreux événements doivent être bloqués en hémifusion, l'hémifusion étant simple et la finalisation de la fusion étant globalement difficile à réaliser et étant, dans ce cas, en plus inhibée par la présence du DOPE.

Nous avons donc fait de la cryo-microscopie électronique sur nos échantillons (DOPC-DOPE 75:25 et POPC-DOPE 75:25), après les avoir laissés fusionner, pour voir si nous étions capables d'observer de l'hémifusion. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, un unique diaphragme a pu être mis en évidence, dans l'échantillon DOPC-DOPE (cf Figure 5.11 du Chapitre 5). Aucun diaphragme n'a été observé dans l'échantillon POPC-DOPE. Pourtant, dans ces deux cas, l'étendue de la fusion et le nombre de vésicules observées au microscope électronique étaient comparables à ceux de l'expérience du POPC. Nous aurions dû, théoriquement, observer à peu près autant de diaphragmes d'hémifusion que ce qui était prévu dans le cas du POPC (environ 700), si ces derniers étaient stables. Nous en avons donc déduit, comme pour le POPC, que de l'hémifusion stable ne survenait pas dans notre échantillon.

Ces résultats invalident donc les hypothèses $\mathcal{H}_2$ et $\mathcal{H}_3$. Il apparaît donc que, dans ces conditions expérimentales, une collision ne puisse pas engendrer de l'hémifusion stable. Elle semble pouvoir soit être inefficace, soit produire de la fusion complète, soit engendrer la formation d'un intermédiaire hémifusionné transitoire qui redonne naissance à deux structures distinctes semblables à celles existant initialement.

Pour vérifier si de tels intermédiaires hémifusionnés étaient formés, nous avons suivi, en parallèle, les mélanges des lipides des deux feuillets et du feuillet interne seulement, pour l'échantillon POPC-DOPE 75:25. Pour cela, les liposomes fluorescents ont été traités ou non avec du dithionite, comme il l'a été explicité pour le POPC dans le Chapitre 5. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.12. On constate que les courbes représentant respectivement les mélanges de lipides totaux et du feuillet interne seulement sont pratiquement superposées. Cela indique que la part de fusion complète est proche de 100%, et invalide donc la possibilité d'avoir une prépondérance d'hémifusion transitoire.

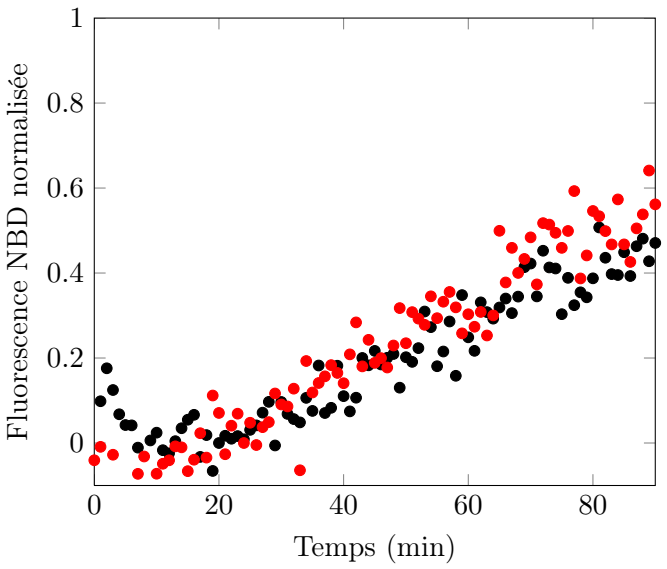


FIGURE 6.12 – **Suivis du mélange total des lipides ou du mélange des lipides du feuillet interne seulement**. La courbe rouge correspond au mélange de lipides de vésicules ayant été préalablement traitées au dithionite tandis que la courbe noire représente le mélange total des lipides de vésicules non traitées. L'expérience est faite pour des vésicules de POPC comprenant 25% de DOPE. Les deux courbes sont pratiquement superposées, ce qui va dans le sens d'un processus intégralement composé d'événements de fusion complète.

Par conséquent, l'hémifusion n'apparaît pas être, ici, une étape du processus de fusion mis en jeu. Il est possible que la fusion procède en une étape, les deux feuillets fusionnant en même temps. Ainsi, l'unique possibilité pour le DOPE d'influencer la fusion est d'inhiber l'ouverture d'un pore, et donc le processus de fusion dans son ensemble, puisque l'étape d'hémifusion n'existe pas dans ce cas. Ceci explique donc pourquoi l'énergie d'activation globale de fusion augmente lors de l'ajout de DOPE dans les vésicules.

C'est peut être également la raison de la différence résidant entre les énergies d'activation de fusion de membranes uniquement composées de DOPC ou de POPC. En effet, dans une moindre mesure, le DOPC est un peu plus conique que le POPC et se comporte peut-être de façon similaire au DOPE.

Revenons maintenant au cas des membranes de PC possédant une fraction de lipides PE et penchons nous sur les différences résidant entre les résultats obtenus pour les membranes DOPC-PE et POPC-PE.

Dans le cas du POPC, l'ajout de 25% de PE fait passer l'énergie d'activation d'environ 31 à 35 k_BT, et l'ajout de 25% supplémentaires fait encore augmenter l'énergie d'activation de la fusion, qui atteint environ 43 k_BT. Cela peut être expliqué par la fraction croissante de PE présent dans la membrane, et donc dans le feuillet interne de celle-ci, provoquant par conséquent une inhibition grandissante de la finalisation de la fusion.

Dans le cas du DOPC, en revanche, l'ajout des 25 premiers pourcents de PE ne modifie pas l'énergie d'activation de la fusion de la membrane. En revanche, l'ajout de 25% supplémentaires de PE fait augmenter l'énergie d'activation, comme dans le cas du POPC. La fusion est peut-être déjà assez difficile à mettre en œuvre pour ne pas être encore plus

limitée en présence de 25% de lipides inhibant la fusion. Néanmoins, l'ajout de 50% de PE finit, là aussi, par influencer la fusion et faire augmenter son énergie globale d'activation.

La différence existant entre les membranes de DOPC et les membranes de POPC semble donc provenir de leurs différences de stabilité intrinsèque respectives.

Le DOPE étant censé être fusogène et l'énergie de fusion augmentant pourtant en sa présence, nous nous sommes également intéressés aux préfacteurs d'Arrhenius puisqu'ils constituent un levier supplémentaire pour favoriser ou inhiber la fusion.

La Figure 6.13 représente l'évolution de ces préfacteurs avec la fraction de DOPE, pour le DOPC et le POPC. On constate que le préfacteur d'Arrhenius n'augmente pas significativement entre 0 et 25% de DOPE. En revanche, il augmente considérablement en présence de 50% de DOPE.

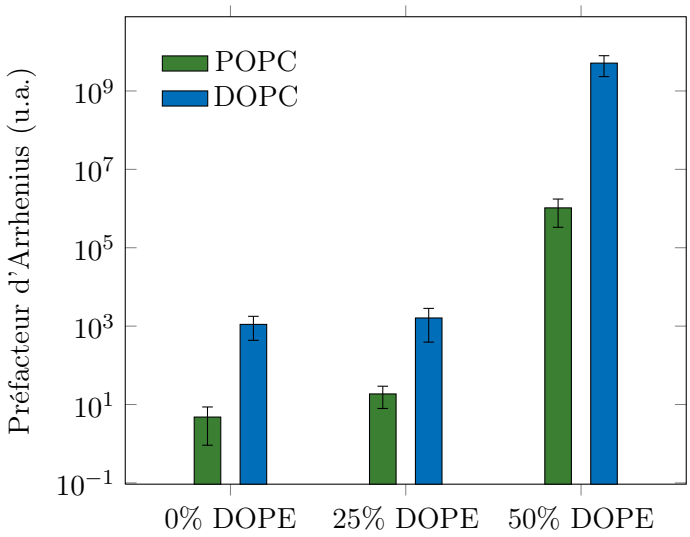


FIGURE 6.13 – **Évolution du préfacteur d'Arrhenius avec le pourcentage de DOPE incorporé aux membranes**. Le préfacteur ne change pas significativement en présence de 25% de DOPE. Il augmente extrêmement fort en présence de 50% de DOPE. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types de trois expériences indépendantes.

Afin de comprendre le comportement du préfacteur d'Arrhenius avec la fraction de PE incorporée aux membranes, nous nous sommes penchés sur les défauts hydrophobes présents à la surface des membranes, toujours grâce aux simulations tous-atomes de ces dernières. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.14. On constate que la densité de défauts hydrophobes en surface des membranes ne change pas significativement en présence de 25% de PE.

La question qui se pose alors est de déterminer pourquoi la fraction de défauts n'augmente pas significativement en présence de 25% de DOPE, malgré sa géométrie.

Les défauts peuvent être de tailles différentes. Ils sont considérés comme « profonds » si le premier atome rencontré en se rapprochant du cœur de la bicouche est situé à plus de un angström en dessous de la ligne moyenne de démarcation entre partie hydrophile et

cœur hydrophobe de la bicouche. On parle de défaut « superficiel » dans les autres cas.

En s'intéressant d'un peu plus près aux résultats, nous nous sommes rendu compte qu'en réalité, l'ajout de 25% de DOPE avait un impact sur les défauts à la surface de la membrane. Si la densité totale de défauts reste identique, la densité de défauts profonds augmente tandis que celle des défauts légers diminue (cf Figure 6.15).

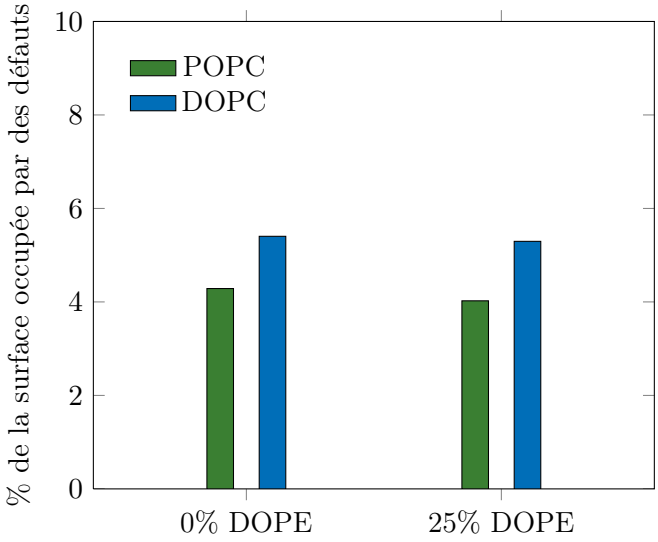


FIGURE 6.14 – **Fraction de la surface occupée par des défauts hydrophobes en fonction du pourcentage de DOPE**. L'ajout de 25% de DOPE ne modifie pas significativement la fraction de défauts à la surface de la membrane. *Résultats sur les défauts obtenus par Patrick Fuchs et Amélie Bacle.*

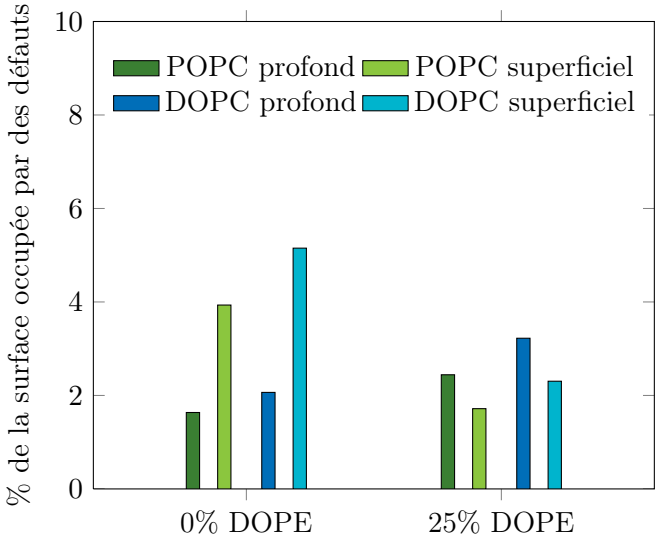


FIGURE 6.15 – **Fraction de la surface occupée par des défauts hydrophobes en fonction du pourcentage de DOPE**. Les défauts profonds (plus profonds que 1 Å) augmentent en présence de 25% de DOPE. Les défauts superficiels diminuent. *Résultats sur les défauts obtenus par Patrick Fuchs et Amélie Bacle.*

Le fait que le nombre de défauts profonds augmente en présence de DOPE est en accord

avec l'idée que ce dernier déstabilise la membrane, étant donné que sa géométrie conique n'est absolument pas adaptée à l'adoption d'une configuration plane. Cela n'explique, en revanche, pas pourquoi le préfacteur d'Arrhenius n'est pas modifié.

Ceci peut être expliqué par le fait que, de par sa courbure spontanée, le DOPE se place préférentiellement sur le feuillet interne des vésicules, qui est courbé négativement et ce, d'autant plus que ces dernières sont petites [4]. Un modèle simple, présenté en Annexe G, prédit que 74% du DOPE se trouve sur le feuillet interne pour des vésicules de 80 nm de diamètre [5]. Cela signifie qu'environ 11% des lipides du feuillet externe seraient des lipides DOPE. La densité de défauts en présence de 25% de DOPE, évaluée par les simulations, est donc une estimation haute de la densité de défauts réelle que nous avons à la surface de nos vésicules, la proportion de DOPE sur le feuillet externe étant en réalité inférieure à 25%. Ceci pourrait expliquer pourquoi le préfacteur d'Arrhenius évolue très peu en présence de 25% de DOPE.

Même si nous n'avons pas de résultat de simulations pour 50% de DOPE, nous pouvons imaginer que la fraction de la surface occupée par les défauts finira par augmenter fortement du fait de l'ajout de DOPE supplémentaire, ce qui expliquerait pourquoi le préfacteur d'Arrhenius finit par croître.

En effet, les défauts à la surface de la membrane devraient augmenter au fur et à mesure que la fraction de PE sur le feuillet externe est accrue, et donc au fur et à mesure que la quantité globale de PE augmente. De plus, cette augmentation est sûrement amplifiée par le fait que la quantité de PE augmentant, sa répartition se fasse de plus en plus symétrique. En effet, le calcul précédent n'est surement plus valide dans le cas des vésicules comprenant trop de PE car il est uniquement valable lorsque chaque DOPE est placé sur un des deux feuillets indépendamment de la répartition des autres DOPE. À titre d'exemple, 80% du feuillet interne serait composé de DOPE dans le cas de vésicules comprenant 50% de DOPE, si le calcul était valide, ce qui est effectivement très difficile à imaginer. Il doit donc exister une transition entre le régime dilué et le régime plus concentré, à partir de laquelle l'augmentation de PE sur le feuillet externe se fait de façon beaucoup plus rapide avec l'augmentation totale de PE. C'est probablement à partir de cette transition que le préfacteur commence également à augmenter de façon très rapide.

La vitesse de fusion est donc dictée par les vitesses respectives d'augmentation du préfacteur d'Arrhenius et de l'énergie d'activation. C'est finalement la combinaison de ces deux paramètres qui donne une idée de la capacité à fusionner d'une membrane. Les vitesses de fusion en fonction du pourcentage de DOPE sont représentées dans la Figure 6.16.

On constate que pour de faibles quantités de PE, la vitesse de fusion semble stable, voire légèrement décroissante, au fur et à mesure que la fraction de DOPE augmente. Ceci peut être expliqué, dans le cas du POPC par une énergie d'activation croissante et un préfacteur

4. Des expériences sont en cours pour tenter de déterminer expérimentalement cette asymétrie.

5. Nous avons montré que l'énergie d'activation augmentait en présence de DOPE, car le DOPE situé sur le feuillet interne inhibait la fusion. Ce phénomène est d'autant plus important que la quantité de DOPE participant à cette inhibition est supérieure à celle qui était attendue, du fait de la répartition asymétrique de ce lipides entre les deux feuillets.

d'Arrhenius constant. Si la proportion de DOPE est encore accrue, la vitesse de fusion augmente fortement. Ceci est dû au fait que, dès que le préfacteur d'Arrhenius commence à croître, sa variation est bien supérieure à celle de l'énergie d'activation. La vitesse de fusion semble donc, dans ce cas, être dominée par la composante due au préfacteur.

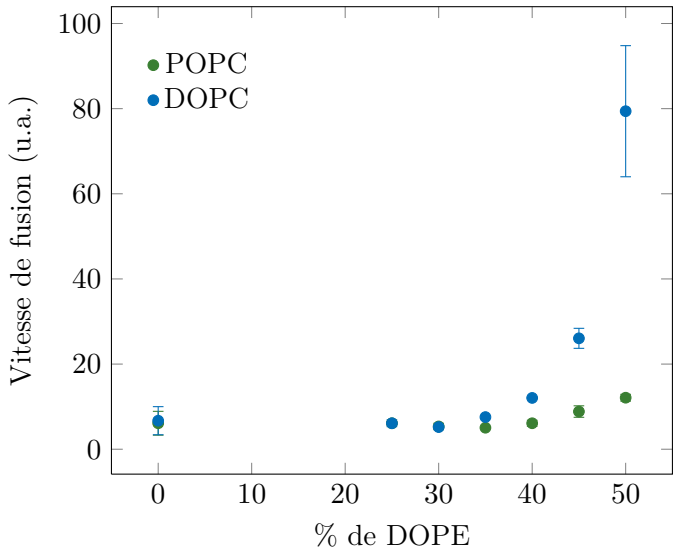


FIGURE 6.16 – **Vitesse de fusion en fonction de la fraction de DOPE**. La vitesse de fusion semble légèrement diminuer au début puis augmente au fur et à mesure que la fraction de DOPE augmente.

La dernière question qui se pose est de savoir pourquoi l'effet de l'ajout de 50% de DOPE est tellement plus important dans le cas du DOPC que dans celui du POPC. Nous ne savons pas à quoi cela peut être dû, mais peut-être que des simulations montreraient une augmentation relative des défauts due à l'ajout d'une quantité supérieure à 25% de PE supérieure dans le cas du DOPC que dans celui du POPC.

Pour conclure, notre protocole permet d'évaluer la vitesse, l'énergie d'activation et le préfacteur d'Arrhenius de la fusion de vésicules de compositions données. Ces trois paramètres permettent d'en apprendre beaucoup sur le caractère plus ou moins fusogène de différentes compositions lipidiques.

De cette façon, nous avons mis en évidence que la fusion n'était pas uniquement conditionnée par la géométrie globale des lipides, et que des lipides présentant des géométries plus ou moins similaires (*i.e.* POPC et DOPC) pouvaient avoir des énergies d'activation très différentes. Ces deux lipides, souvent utilisés arbitrairement l'un à la place de l'autre, ont en réalité un comportement différent vis à vis de la fusion.

Nous avons aussi réalisé, grâce à l'étude du PE, que, du fait de la multitude de paramètres mis en jeu, il était très difficile de prévoir le pouvoir fusogène d'une membrane uniquement au vu de sa composition lipidique. Notre étude ne prétend donc pas donner les clés pour permettre de prévoir l'énergie d'activation de membranes de n'importe quelle composition mais permet théoriquement de la mesurer relativement facilement. Nous avons décidé de procéder ainsi et présenterons, dans le chapitre suivant, les résultats d'expériences visant à obtenir des estimations d'énergies d'activation de fusion plus physiologiques.

Chapitre 7

Vers un système plus physiologique...

Dans cette étude, nous nous sommes peu à peu orientés vers des systèmes de complexité croissante, avec pour objectif de finir par l'analyse d'un système aussi physiologique que possible. Nous avons, par ailleurs, vu que la fusion membranaire était à la base de nombreux processus chez les organismes vivants. Nous avons donc décidé de sélectionner un des types de fusion existant *in vivo*, de former des vésicules mimant les deux membranes mises en jeu, et de mesurer l'énergie d'activation de leur fusion.

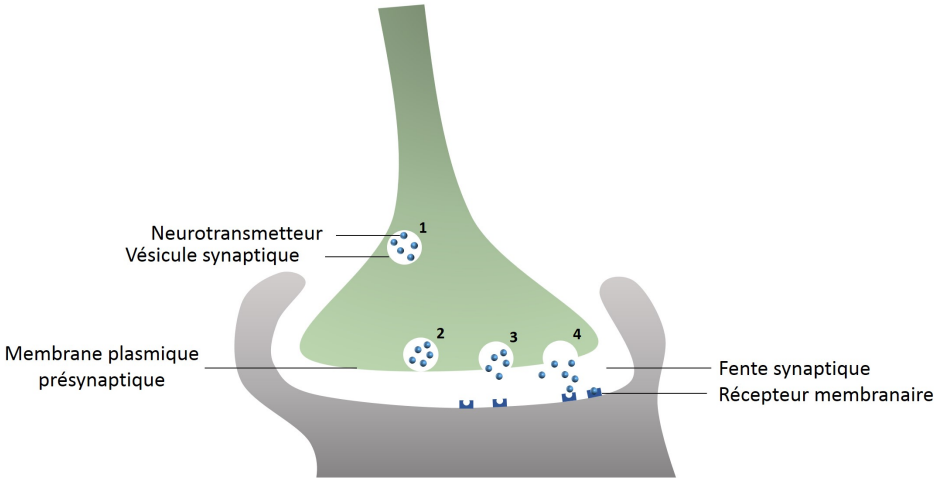


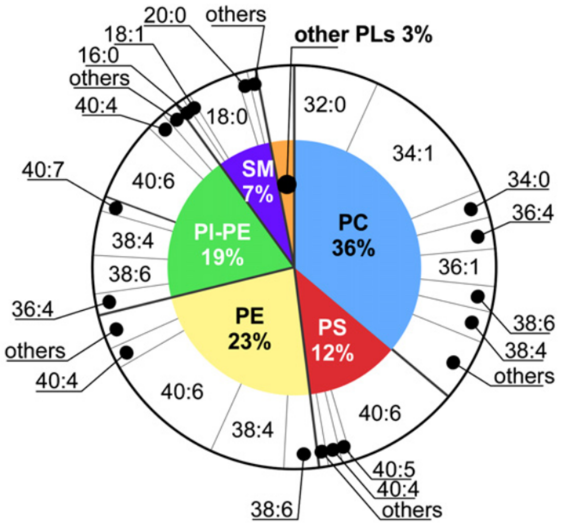
FIGURE 7.1 – **Exocytose des neurotransmetteurs au niveau de la synapse**. Les neurotransmetteurs, initialement encapsulés dans une vésicule synaptique, sont libérés dans la synapse grâce à la fusion de cette vésicule avec la membrane présynaptique du neurone.

La fusion membranaire est une étape primordiale de l'exocytose des neurotransmetteurs au niveau de la synapse (cf Figure 7.1). La vésicule synaptique, localisée en amont de la synapse, contient les neurotransmetteurs. Au moment de l'arrivée d'un potentiel d'action, des canaux ioniques s'ouvrent dans la membrane présynaptique, ce qui entraîne l'entrée de calcium dans le neurone et déclenche la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique présynaptique. Les neurotransmetteurs sont alors libérés dans la synapse, et peuvent être captés par des récepteurs localisés sur la membrane plasmique du neurone

situé en aval.

Nous avons donc décidé de mesurer l'énergie d'activation de la fusion de vésicules mimant la membrane présynaptique du neurone avec des vésicules représentant la vésicule synaptique.

La composition lipidique des vésicules synaptiques de rat (cf Figure 7.2) a été déterminée par Takamori *et al.* en 2006 [7]. C'est donc sur cette étude que nous nous sommes fondés pour choisir la composition que nous utiliserions pour mimer celle des vésicules synaptiques. La composition choisie (VS) est présentée dans la Figure 7.4.



Membrane lipid	ng lipid/µg protein
Phosphatidylcholine	186 ± 37
Phosphatidylethanolamine	
1- ester	120 ± 18
1- ether (plasmalogen)	96 ± 14
Phosphatidylserine	68 ± 7.2
Phosphatidylinositol	9.73 - 10*
Sphingomyelin	37 ± 5.1
Cholesterol	215 ± 25
Hexylceramide	8.6 ± 4.0
Ceramide	1.2 ± 0.1
Protein : Phospholipid (w/w)	1.94 ± 0.23

FIGURE 7.2 – **Composition lipidique des vésicules synaptiques de rats**. *Figure extraite de [7].*

Van Meer *et al.* se sont penchés sur les compositions lipidiques de nombreuses membranes (cf Figure 7.3), y compris celle de la membrane plasmique [14]. Nous nous sommes fondés sur cette étude pour déterminer les fractions de chaque type de tête polaire utilisées pour mimer la composition lipidique de la membrane plasmique. Cette étude ne comporte, en revanche, aucune information sur les chaînes carbonées associées à chaque type de tête polaire. Nous avons donc décidé de travailler avec des extraits naturels commerciaux, à partir de cerveaux de porcs, pour avoir un mélange le plus physiologique possible de l'éventail de queues associé à chaque type de lipide. La composition choisie (MP) est présentée dans la Figure 7.4.

Nous avons alors déterminé l'énergie d'activation de la fusion survenant entre les vésicules mimant la membrane plasmique du neurone et celles représentant la vésicule synaptique. À titre de comparaison, nous avons également mesuré l'énergie d'activation de la fusion de deux vésicules mimant la membrane plasmique. En effet, la composition lipidique exacte de la membrane plasmique présynaptique des neurones n'est pas connue, donc la composition MP ne la représente pas parfaitement. De plus, nous ne voulions pas nous focaliser sur son comportement propre vis à vis de la fusion mais souhaitions, en revanche, voir si la composition lipidique des vésicules synaptiques pouvait être reliée à

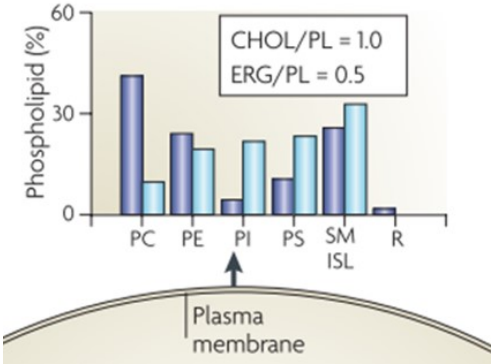


FIGURE 7.3 – **Composition lipidique d'une membrane plasmique type**. Les fractions respectives de chaque tête polaire sont présentées en bleu foncé pour les mammifères et en bleu clair pour la levure. L'ergostérol est l'analogue du cholestérol chez la levure. Les rapports entre la quantité de stérols et de phospholipides (PL) sont indiqués dans l'encadré. *Figure adaptée de [14].*

Lipide	MP
Cholestérol	50%
Brain PC	20%
Brain PE	12%
Brain PIP2	2%
Brain PS	5%
Brain SM	11%

Lipide	VS
Cholestérol	33%
POPC	16%
18:0-22:6 PS	8%
18:0-22:6 PE	11%
18:0-20:4 PE	5,5%
18(Pl):0-22:6 PE	9%
18(Pl):0-20:4 PE	4,5%
18:0 SM	4,5%
DPPC	5,5%
NBD-DOPE	1,5%
Rh-DOPE	1,5%

FIGURE 7.4 – **Fractions des différents lipides pour MP et VS**. Une partie des vésicules doivent être fluorescentes pour que la mise en évidence de la fusion soit possible. C'est pour cela que nous avons intégré 1,5% de NBD et 1,5% de Rh à la composition lipidique VS.

leur propension à fusionner.

Nous avons trouvé une énergie de l'ordre de $31,9 \pm 0,7\, k_B T$ [1] pour la fusion de vésicules MP avec des vésicules MP et de l'ordre de $26,4 \pm 1\, k_B T$ pour la fusion de MP avec VS.

Il apparaît donc que la fusion VS-MP requiert moins d'énergie que MP-MP, et donc qu'un ou plusieurs éléments de VS peuvent potentiellement être responsables de cette baisse d'énergie d'activation.

Une piste d'explication de ce phénomène est offerte par les lipides comprenant des chaînes carbonées polyinsaturées (PUFA, acronyme de l'anglais *polyunsaturated fatty acid*). En effet, la fraction de ces lipides est très importante dans les vésicules synaptiques. Or, il a été montré que ces lipides pouvaient adapter leur conformation à la courbure de la membrane, et ainsi favoriser sa déformation [67]. De plus, il a été suggéré que l'adoption

1. Cette énergie est très proche de celle trouvée pour la fusion de vésicules de POPC. De ce point de vue, il est donc fondé de considérer que les membranes cellulaires peuvent être, en première approximation, modélisées par des bicouches de POPC.

d'une conformation étendue par un ou plusieurs lipides soit très importante pour l'initiation de la fusion, et que les PUFAs soient plus sujets à adopter ce type de configuration [53]. Les lipides polyinsaturés sont donc de bons candidats pour favoriser la fusion, en faisant par exemple baisser son énergie d'activation.

Nous avons donc mesuré l'énergie d'activation de la fusion de vésicules intégralement composées 16:0-22:6 PC [2] (cf Figure 7.5). L'énergie mesurée est très basse - de l'ordre de $17,3 \pm 0,9\, k_B T$ - ce qui va dans le sens de notre hypothèse quant au rôle des polyinsaturés dans l'abaissement de l'énergie d'activation de la fusion des vésicules synaptiques par rapport à d'autres types de membranes.

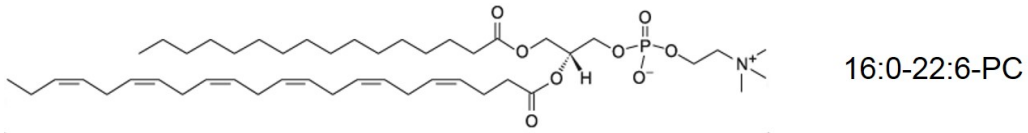


FIGURE 7.5 – **Représentation chimique du 16:0-22:6 PC**. Une des queues hydrophobes du lipide est formée à partir d'un acide gras polyinsaturé (comportant six doubles liaisons). Ces liaisons étant généralement bloquées en conformation *trans*, le volume exploré par les queues hydrophobe est accru.

L'énergie d'activation n'étant pas le seul paramètre dictant la vitesse de fusion, nous avons également comparé les préfacteurs d'Arrhenius des expériences de fusion MP-MP et MP-VS, pour avoir une idée de la propension intrinsèque de la nucléation de fusion dans les deux cas (cf Figure 7.6). On remarque que le préfacteur est bien plus haut dans le cas MP-MP que dans le cas MP-VS.

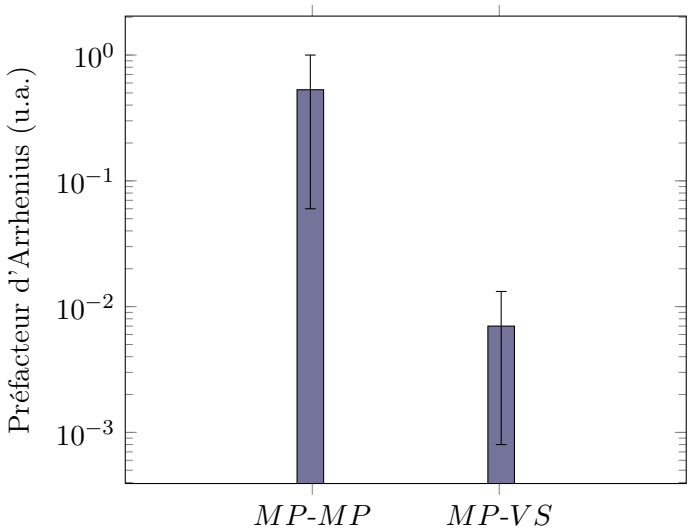


FIGURE 7.6 – **Préfacteur d'Arrhenius en fonction de la composition lipidique des membranes mises en jeu**. Le préfacteur est significativement plus bas lors de la fusion entre VS et MP qu'entre MP et MP.

2. Pour ces lipides, les expériences ont été faites à 6 mM en lipides, et non à 18 mM comme pour les autres compositions lipidiques, les préfacteurs d'Arrhenius ne sont donc pas comparables.

Pour conclure, l'énergie d'activation de la fusion VS-MP est plus basse que celle de la fusion MP-MP, ce qui peut permettre à la vésicule synaptique de fusionner relativement facilement avec la membrane.

En revanche, son taux de nucléation est extrêmement faible, ce qui est peut-être nécessaire pour prévenir une fusion spontanée, et qui permet potentiellement à ce type de fusion d'être finement régulé.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de parvenir à développer un protocole permettant une étude expérimentale aussi complète que possible des aspects énergétiques de la fusion de vésicules lipidiques. Nous souhaitions mesurer l'énergie d'activation et les taux de fusion pour différentes compositions lipidiques et en interpréter la signification. Au delà, nous aspirions à en obtenir des ordres de grandeur pour des compositions aussi physiologiques que possible.

Dans cette optique, nous avons corrélé la vitesse de fusion spontanée de vésicules lipidiques avec la température, afin de déterminer l'énergie d'activation et le préfacteur d'Arrhenius du processus.

La fusion membranaire est généralement détectée par l'intermédiaire du partage de lipides qui l'accompagne, et qui peut être mis en évidence par le FRET. Au cours de cette étude, nous nous sommes rendu compte qu'il était difficile de quantifier les vitesses de fusion de manière absolue à partir des signaux de fluorescence, du fait de leur dépendance à la température. Nous avons donc travaillé à développer des calibrations permettant une telle quantification, et donc une comparaison des différentes vitesses, autorisant *in fine* la détermination de l'énergie d'activation et du préfacteur d'Arrhenius.

Nous avons alors pu évaluer à environ $31\,k_BT$ l'énergie d'activation de la fusion de membranes uniquement composées de POPC, lipide très présent dans les membranes biologiques. Cette estimation nous paraît plausible. En effet, elle correspond à une énergie que les SNAREs, principaux acteurs de la fusion intracellulaire, sont capables de développer, et se situe dans la fourchette des estimations théoriques et numériques la concernant.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à des vésicules de DOPC, un lipide présentant de multiples similitudes avec le POPC. L'énergie d'activation mesurée s'est avérée significativement différente - de l'ordre de $39\,k_BT$. Nous en avons déduit que les énergies d'activation étaient difficilement prévisibles à la simple vue de la composition lipidique.

Afin d'étudier des systèmes de complexité croissante et de se rapprocher de compostions physiologiques, nous nous sommes alors intéressés au DOPE et au POPE. Ces lipides sont considérés comme *fusogènes* car ils sont censés favoriser l'hémifusion, la première étape théorique du processus de fusion. Ils sont cependant également réputés pour inhiber la finalisation de la fusion. Nous avons montré que l'énergie d'activation de la fusion membranaire augmentait en présence de ces lipides et qu'il n'y avait pas d'hémifusion stable. Nous en avons conclu que, dans ce cas, l'étape d'hémifusion apparaissait être, tout au plus, un état transitoire sur le chemin de la fusion. D'un point de vue plus général, l'hémifusion

ne semble donc pas être, systématiquement, une étape de la fusion. D'autre part, une étude du préfacteur d'Arrhenius nous a amené à envisager que la nucléation de la fusion, levier supplémentaire pour la promouvoir ou l'inhiber, soit favorisée par la présence de défauts hydrophobes à la surface des membranes.

Étant donnée la multitude de paramètres mis en jeu, il est particulièrement difficile de prédire des énergies d'activation, des préfacteurs d'Arrhenius, et donc plus largement des vitesses de fusion. Notre étude ne prétend donc, en aucun cas, donner les clés pour prévoir des énergies d'activation à partir de principes généraux. Elle permet, en revanche, de les mesurer de façon relativement simple et rapide.

Il est donc encore impossible d'estimer des énergies d'activation de différents types de fusion se déroulant *in vivo*, en connaissant les compositions lipidiques respectives des organelles concernées. Afin d'obtenir un ordre de grandeur plus physiologique pour la fusion de membranes lipidiques, nous avons décidé de choisir un type de fusion survenant *in vivo*, de former des vésicules dont la composition lipidique serait le plus proche possible des membranes concernées, et de mesurer leur énergie de fusion. Notre choix s'étant porté sur l'exocytose régulée des neurotransmetteurs au niveau des synapses, nous avons produit deux types de vésicules : l'une mimant la membrane plasmique (MP), l'autre la vésicule synaptique (VS). L'énergie d'activation de fusion VS-MP s'est avérée plus basse que celle MP-MP, expliquant éventuellement la propension des vésicules synaptiques à fusionner relativement facilement. En parallèle, nous avons également montré que le taux de nucléation de fusion VS-MP était, en revanche, amoindri, ce qui pourrait potentiellement permettre à ce type de fusion d'être finement régulé.

L'ensemble de ces résultats confirme que la composition lipidique peut permettre de réguler la fusion membranaire. Néanmoins, il ne faut pas oublier que les membranes biologiques sont loin d'être purement lipidiques et que les propriétés du feuillet lipidique peuvent être très fortement modifiées par la présence de multiples protéines ancrées en son sein.

Dans l'optique de poursuivre ce travail de recherche, une étude de l'influence de la présence de protéines sur la fusion de bicouches lipidiques serait donc extrêmement intéressante à mener. De la même façon, l'analyse de l'influence de la courbure et de l'asymétrie des membranes apporterait un éclairage complémentaire à cette thèse.

Annexe A

Préparation des LUV

Pour cette étude, tous les lipides utilisés pour la préparation des vésicules ont été achetés chez Avanti Polar Lipides (http: //avantilipids.com).

La plupart des lipides sont vendus solubilisés dans du chloroforme, mais d'autres l'étaient dans une solution chloroforme-méthanol (SM 18:0, Brain PIP2) ou sous forme de poudre (Cholestérol). Les lipides achetés en poudre ont été solubilisés par nos soins dans du chloroforme (ou du méthanol pour la SM 18:0).

Les lipides sont conservés dans leur solvant organique dans des tubes en verre avec des septa en téflon car le chloroforme attaque le plastique. La conservation se fait à -20°C et sous argon [1], un gaz inerte qui permet de limiter l'oxydation des lipides lors de leur conservation.

Pour préparer les vésicules, les différents lipides sont tout d'abord prélevés à l'aide de seringues Hamilton en verre, mélangés dans un tube en verre propre puis vortexés ensemble pour homogénéiser la solution.

Dans un deuxième temps, le solvant est évaporé sous un flux d'azote. Un film lipidique est alors déposé sur les parois du tube et on se débarrasse ensuite de toute trace résiduelle de solvant en mettant les tubes sous vide pendant au moins deux heures - le solvant dans lequel étaient initialement conservés les lipides importe donc peu [2].

Les films lipidiques sont alors hydratés avec une solution aqueuse tamponnée (25 mM HEPES, 100 mM KCl, pH=7.4, nommée *Tampon A* par la suite) de sorte à obtenir une concentration en lipides de 18 mM [3].

L'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) sert à tamponner la solution. Cette molécule est couramment utilisée en culture cellulaire car elle maintient facilement un pH physiologique, même en cas de changement de concentration de dioxyde de carbone. Le KCl est utilisé pour fixer la concentration en sel et donc l'osmolarité de la solution. Le pH est ajusté à 7,4, pH physiologique, par ajout de KOH [4].

1. L'azote peut aussi être utilisé mais la densité importante de l'argon rend plus facile le remplacement de l'air présent dans le tube par l'argon qui y est injecté.
2. Il faut, en revanche, qu'il soit le plus pur possible pour éviter toute forme de contamination.
3. Le choix de cette concentration pour les expériences est discuté dans le Chapitre 5. À cette concentration, on considère que l'hydratation des membranes est complète.
4. Si le sel utilisé avait été NaCl, NaOH aurait été choisi pour ajuster le pH.

Les tubes sont laissés sous agitation une dizaine de minutes pour décoller tous les lipides des parois des tubes et former les liposomes multilamellaires (MLV). Cette étape se fait généralement à température ambiante mais, dans le cas des lipides saturés, elle doit être menée au dessus de leur température de transition.

Les liposomes sont ensuite soumis à cinq cycles de congélation-décongélation, par trempe dans de l'azote liquide, dont la température est de -195,79°C, et fonte dans un bain d'eau à 37°C (ou au dessus de leur température de transition pour les lipides saturés).

C'est une technique pour rendre les liposomes plus unilamellaires, empirique et parfois controversée car jugée inutile. L'idée repose sur le fait que l'eau sous forme solide occupe plus de place que l'eau liquide. En congelant les liposomes, le volume enfermé par la membrane augmente, et entraîne sa rupture. Lors de la décongélation, les structures internes pourraient être libérées avant que la structure externe ne se referme sur elle-même.

Un apport d'énergie supplémentaire est nécessaire pour passer à des structures plus petites ; les LUV sont obtenues après extrusion de ces liposomes. La solution de liposomes est forcée à passer 21 fois à travers un filtre en polycarbonate contenant des pores d'une taille définie [99]. Les membranes se rompent de façon à donner des structures plus petites.

Les filtres utilisés présentent des pores de 50 nm (# 610003, Avanti Polar Lipids).

Les LUV sont alors conservées à 4°C, sous argon, pour limiter leur oxydation et leur fusion. Elles sont laissées au repos sur la nuit, avant de faire l'expérience, pour être sûr qu'un état d'équilibre soit atteint (relâchement de la tension) et que les LUV soient ensuite stables sur 36 heures - temps pendant lequel les liposomes seront utilisés pour l'expérience.

Annexe B

Évolution du modèle du *stalk*

Le *stalk*, initialement décrit par Gingell et Ginsberg en 1978, est considéré comme l'intermédiaire crucial de la fusion de bicouches lipidiques. Les feuillets externes des deux bicouches sont reliés en formant une structure semblable à un sablier, tandis que les feuillets internes restent intacts.

En 1993, Siegel montre que le *stalk*, tel qu'il a été proposé initialement [35] (cf Figure B.1a), fait intervenir des espaces « vides », ou interstices hydrophobes, beaucoup trop coûteux en énergie pour que la fusion procède par cette voie [21]. En effet, les deux moyens évidents pour combler ces interstices sont de courber très fortement les bicouches *trans* ou bien d'allonger les chaînes des lipides vers les interstices. D'un point de vue énergétique, il n'est pas favorable de trop courber les monocouches, du fait du module de courbure non nul des monocouches lipidiques. De la même façon, étendre les chaînes des lipides limite l'entropie conformationnelle des lipides concernés, et accroît leur énergie.

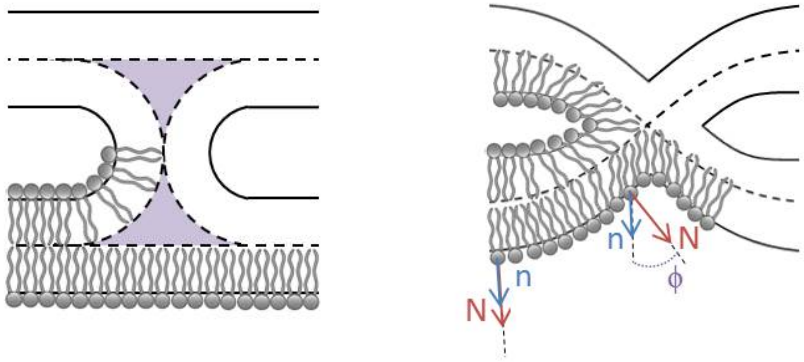
Par la suite, de nombreuses modifications ont été proposées pour trouver une structure dont le niveau énergétique était raisonnable.

La première correction apportée au modèle consiste à autoriser l'inclinaison des lipides, ou *tilt* en anglais, soit la déviation de l'axe du lipide par rapport à la normale de la bicouche (cf Figure B.1b). Il avait été prouvé que ce processus était courant lorsque les membranes étaient localement fortement déformées [100, 101]. Le fait que l'inclinaison des lipides puisse aider la fusion est proposé à peu près au même moment par Kuzmin [22], Kozlovsky [24], Markin [23] et May [26]. Cela permet d'introduire des angles dans les monocouches, sans pour autant trop courber les membranes, et de combler les interstices vides, ce qui a pour résultat d'abaisser le niveau énergétique du *stalk* (cf Figure B.1b).

En 2001, Kuzmin [22] revient sur l'idée de Leikin que le *stalk* puisse être créé entre deux protubérances, et montre que cela abaisse l'énergie d'activation de formation du *stalk*, par rapport aux calculs précédents où les bicouches étudiées étaient initialement parallèles [1].

Dans le même esprit, Stevens suggère en 2003 que l'initiation de la fusion se fasse dans un endroit très courbé [54]. À la différence de Kuzmin, cependant, cet endroit n'apparaît pas à l'endroit initial d'approche des bicouches mais en périphérie de la zone membranaire

1. Kozlovsky et Kozlov remettront en cause cette solution car l'énergie nécessaire pour former une telle protubérance est énorme [24], donc cela ne règle pas le problème



(a) **Modèle initial du *stalk*.**

(b) **Un modèle modifié de *stalk*.**

FIGURE B.1 – **Évolution du modèle du *stalk*.** a) Schéma du modèle initial du *stalk*, comportant des zones « vides » (surfaces violettes) très coûteuses en énergie. b) Schéma d'un *stalk* modifié. La modification consiste principalement à faire intervenir la possibilité d'inclinaison des lipides (absence de coïncidence entre la normale à la monocouche lipidique N et l'axe du lipide n : $\phi \neq 0$). Cela permet de combler les interstices hydrophobes présents dans le modèle initial et d'abaisser le niveau énergétique de cet intermédiaire de fusion.

aplatie par l'apposition des membranes, une région présentant une forte courbure.

De plus, Markin propose également de revoir la géométrie même du *stalk* pour annuler sa courbure totale [23], et diminuer ainsi son énergie. Pour cela, les deux feuillets ayant hémifusionné ne forment pas une portion de sphère mais une structure légèrement différente dont les rayons de courbure sont tels que la courbure totale soit nulle.

Stevens revient également sur la possibilité pour les lipides d'adopter la conformation étendue introduite par Kinunnen. Seulement, les deux queues hydrophobes ne sont pas forcément introduites dans les deux membranes en regard à la fois, mais plusieurs lipides peuvent sortir simultanément une de le leurs chaînes de la membrane et les regrouper pour former une zone hydrophobe entre les bicouches et nucléer un point de fusion. C'est le point de vue qui est majoritairement adopté récemment, et qui est présenté dans la revue de Markvoort [53].

En parallèle, il a également été établi que l'épaisseur des bicouches pouvait varier [102]. Kuzmin propose que le fait de pouvoir comprimer les monocouches lipidiques en épaisseur puisse également permettre la formation d'un intermédiaire d'énergie plus basse [22].

Il a ensuite été montré que les lipides pouvaient fluctuer indépendamment les uns des autres selon la normale de la bicouche [103], ce qui peut aussi, permettre la formation d'angles dans les membranes sans devoir les courber.

Toutes ces corrections ont pour conséquence de rendre l'énergie du *stalk* moins haute, et régler la « crise » soulevée par Siegel en 1993 [21].

Annexe C

Artéfacts potentiels liés au changement de température pour la mesure de $E_{\mathbf{A}}$

Le principe de notre étude consiste à déterminer l'énergie d'activation de la fusion membranaire en corrélant sa vitesse de fusion spontanée avec la température. D'après la distribution de Maxwell-Boltzmann, la proportion de collisions ayant une énergie dépassant une énergie seuil augmente avec la température. Il s'ensuit que la vitesse de fusion, dépendant de la fréquence des collisions efficaces - libérant une énergie supérieure à E_{A} - augmente aussi avec la température, et que la vitesse à laquelle elle croît dépend de E_{A}.

Or, la vitesse de fusion spontanée varie également avec la température par d'autres intermédiaires, puisque l'état de la membrane peut être modifié avec celle-ci. Il est donc difficile de séparer la composante provenant de l'énergie d'activation et la composante résultant d'une facilitation de la fusion par un changement de l'état de la membrane. En effet, les deux peuvent en réalité être regroupés dans une énergie d'activation dépendant de la température.

Si, pour autant, la variation de l'énergie d'activation sur la gamme de température balayée est de l'ordre de grandeur de l'erreur commise sur sa mesure, celle-ci peut être déterminée de cette manière. Cela revient à dire que l'évolution de la vitesse due au changement de la membrane est négligeable devant celle résultant de la proportion accrue de collisions efficaces.

Cette annexe vise à recenser l'ensemble des arguments qui sont en faveur d'une telle hypothèse. Nous souhaitons insister sur le fait que, seul, aucun de ces arguments n'est suffisant. Cependant, leur ensemble nous laisse penser qu'une bonne estimation de l'énergie d'activation peut être déterminée de cette manière.

Pour que notre mesure soit convenable, il faut que l'état de la membrane soit assez peu modifié sur la gamme de température étudiée, pour que l'effet engendré sur la vitesse de fusion soit négligeable devant son augmentation exponentielle résultant de la composante d'Arrhenius.

Nous avons vu, dans le Chapitre 2, qu'une augmentation de la température favorisait la formation de pores, augmentait la probabilité que les lipides adoptent une conformation étendue, et faisait croître le volume effectif des queues hydrophobes des lipides. La fluidité de la membrane et sa tension de surface font également partie des paramètres qui peuvent changer avec la température. Nous prendrons l'exemple de la fluidité et exposerons les arguments qui nous laissent à penser qu'elle change peu sur notre gamme de température, si on se place suffisamment loin de la température de transition des lipides.

Le recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (ou FRAP, acronyme de l'anglais *Fluorescence recovery after photobleaching*) est une technique fondée sur le fait que la fluorescence d'un échantillon puisse être détruite de manière irréversible si l'excitation est trop importante [1]. Si une zone d'une membrane fluorescente est illuminée de façon à supprimer toute sa fluorescence, cette dernière va tomber à zéro puis remonter peu à peu, au fur et à mesure que les molécules fluorescentes, initialement présentes à l'extérieur de la zone photo-blanchie, repeuplent cette zone du fait de la diffusion. Le temps caractéristique après lequel une valeur de fluorescence stable est retrouvée est lié au coefficient de diffusion, et donc à la fluidité de la membrane.

La Figure C.1 représente les coefficients de diffusion en fonction de la température, déterminés par des expériences de FRAP sur des vésicules géantes de POPC contenant 1% de lipides NBD-DOPE.

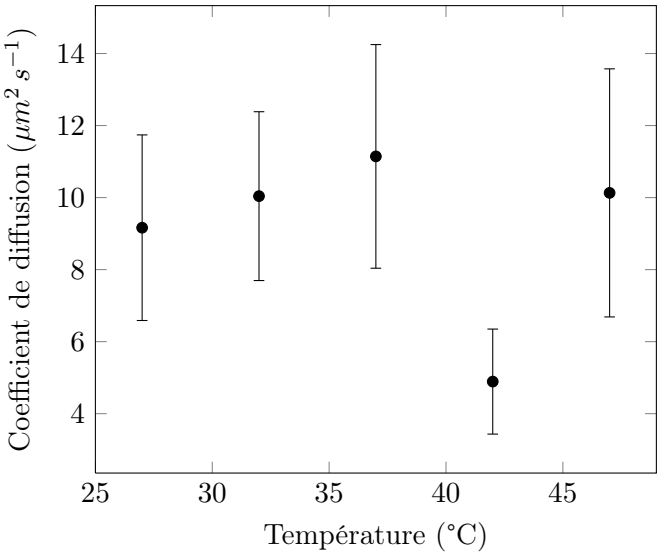


FIGURE C.1 – **Coefficient de diffusion des lipides en fonction de la température**. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs sur la moyenne, déterminées en divisant l'écart-type des valeurs par le nombre d'expériences indépendantes (4).

Même si les barres d'erreurs sont très grandes, la fluidité ne semble pas augmenter avec la température de façon flagrante. Néanmoins, les conséquences sur la vitesse de fusion sont plus compliquées à estimer. En effet, même si la fluidité n'augmente que très légèrement,

1. La structure de la molécule fluorescente peut être détériorée de manière irrémédiable, ce qui supprime sa capacité à émettre de la lumière.

rien ne prouve que l'effet engendré sur la vitesse de fusion ne sera pas, lui, exponentiel, par exemple.

Nous avons donc fait une autre expérience, en adoptant la stratégie inverse. Nous avons choisi un lipide dont la température de transition était haute (DMPC, $T_{trans} = 24°C$), de façon à vérifier si, dans ce cas, l'effet d'un changement de fluidité serait flagrant sur la courbe d'énergie d'activation [2]. Même si la première mesure est faite à 27°C, ce n'est manifestement pas assez loin de la température de transition du lipide, et aucune fusion n'est détectable [3] (cf Figure C.2). En revanche, à partir de 32°C, les vitesses de fusion ont atteint un régime où elles augmentent de façon exponentielle avec la température.

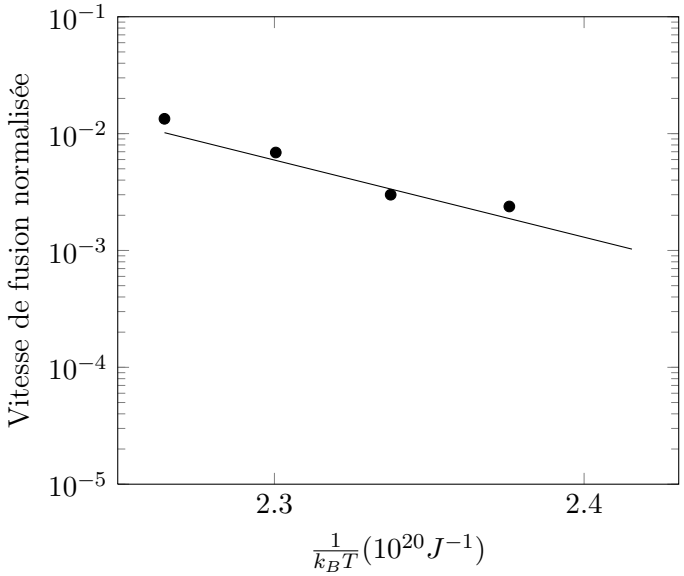


FIGURE C.2 – **Tentative de mesure d'énergie d'activation de la fusion de vésicules de DMPC**.

Ces résultats montrent que lorsque la fluidité change beaucoup avec la température, cela transparaît tout de suite sur la courbe d'énergie d'activation, ce qui est rassurant quant aux expériences où ce n'est pas le cas.

Pour ce qui est du reste de la courbe, dont l'allure est exponentielle, il est possible que cela montre que la fluidité ne change plus beaucoup, et que la seule composante de la variation de la vitesse de fusion provienne de la proportion accrue de collisions efficaces. Il est cependant possible que la fluidité change et impacte de façon exponentielle la vitesse de fusion. Le produit de deux exponentielles en étant une, il est plausible que cela ne se voit pas et que l'on estime mal l'énergie d'activation.

Pour autant, la probabilité que tous les paramètres changeant avec la température (la géométrie des lipides, leur propension à adopter une conformation étendue *etc.*) aient pour conséquence de faire augmenter la vitesse de fusion de façon exponentielle est assez faible.

2. Le protocole décrit dans le Chapitre 5 pour le POPC.
3. La pente de fusion est en réalité très légèrement négative, elle n'est pas représentée sur la graphique.

Le dernier point sur lequel nous souhaitons nous appesantir est qu'il est difficile d'imaginer qu'une hausse de température impacte la membrane de façon à inhiber la fusion. De ce fait, supposons que l'on trouve un paramètre dont la variation avec la température ait pour conséquence de faire changer la vitesse de fusion de façon exponentielle, l'énergie d'activation serait, dans ce cas, surestimée.

Or, nos résultats d'énergies d'activation (entre 30 et 50 $k_B T$) se situent en bas de la fourchette des estimations théoriques et des simulations numériques, et sont, indépendamment de cela, assez basses. Il est donc difficile d'imaginer que nous les ayons fortement sur-estimées car sinon, la fusion se ferait de façon spontanée.

Annexe D

Estimation de la pente de la courbe

De manière à déterminer la cause de la phase initiale où l'intensité de fluorescence n'augmente pas - voire même diminue, nous avons réalisé une autre expérience. Cette fois, les deux types de liposomes (marqués ou non) ont été incubés séparément à 37°C (température à laquelle le test de fusion est réalisé) avant le début de l'expérience, et un seul test de fusion a été réalisé à la fois pour réduire le temps nécessaire au mélange des deux types de liposomes à température ambiante et au lancement de l'expérience. La courbe correspondante est représentée en rouge dans la Figure D.1.

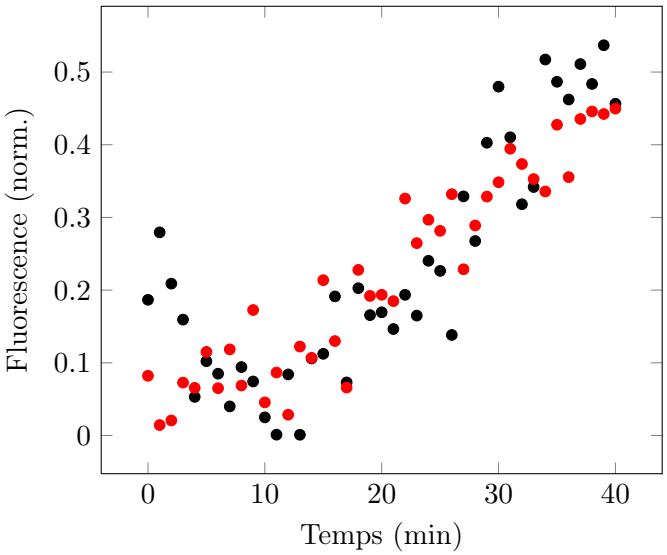


FIGURE D.1 – La courbe rouge correspond à une expérience où un seul échantillon a été étudié et où les liposomes ont été pré-incubés à 37°C avant d'être mélangés pour suivre leur fusion. Il n'y a pas de phase initiale où la l'intensité de fluorescence diminue comme dans le cas de la courbe noire, où plusieurs échantillons ont été préparés en parallèle et non préchauffés. Les courbes se rejoignent et présentent une pente similaire au bout de dix minutes. *Composition lipidique : POPC.*

On remarque que, dans ce cas, contrairement aux expériences habituelles (type courbe noire de la Figure D.1), la phase initiale où l'intensité de fluorescence ne croît pas disparaît. Celle-ci résulte donc bien d'un effet de température.

De plus, on constate qu'une fois que l'intensité de fluorescence augmente, les pentes des deux courbes sont similaires. Il est donc possible, en règle générale, de travailler avec des courbes possédant des allures du type de la courbe rouge, sous réserve de mesurer la pente à l'endroit où elle est maximale. Cela permet de pouvoir réaliser plusieurs expériences en parallèle et de ne pas se soucier du temps de préparation des échantillons, où la plaque et les liposomes refroidissent légèrement.

Annexe E

Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est une technique non destructive permettant de déterminer la distribution de tailles d'une population de particules colloïdales en suspension en solution.

Du fait de leur taille, les particules se déplacent sous l'effet de l'agitation thermique et adoptent un mouvement de type brownien. La vitesse à laquelle diffusent les particules dépend de leur taille et est traduite par leur coefficient de diffusion (cf Équation E.1). La détermination du coefficient de diffusion des particules est possible grâce à l'étude de la variation temporelle de la lumière diffusée par l'échantillon.

$$R_{hydro} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \tag{E.1}$$

avec R_{hydro} le rayon hydrodynamique de la particule [a], k_B la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, η la viscosité dynamique du fluide et D le coefficient de diffusion transversale.

a. On remarque que la taille qui sort de cette équation n'est pas directement la taille mais le rayon hydrodynamique, soit le rayon d'une sphère qui diffuserait de la même façon que la particule étudiée. Il est en général légèrement plus grand que la taille réelle.

Le principe est d'éclairer la solution de colloïdes avec un laser, et d'observer le signal optique recueilli en sortie d'échantillon.

Si l'échantillon ne contenait qu'une seule particule, il existerait des taches de diffraction de part et d'autre de la tache centrale où pointe le faisceau incident du laser. Étant donnés le nombre de diffuseurs de l'échantillon, le nombre de taches de diffraction est infini et un signal optique est émis dans toutes les directions.

Dans une direction donnée (l'endroit a peu d'importance pour l'instant), le signal fluctue dans le temps à cause du mouvement aléatoire des particules soumises au mouvement brownien. Le signal optique est recueilli en sortie d'échantillon par un photomultiplicateur. Un corrélateur traite le signal en temps réel et compare le signal à un temps t et à un temps $t + \tau$. Cela permet d'obtenir une fonction d'autocorrélation, qui décroit de façon exponentielle avec le temps τ. Globalement, pour un τ très faible, la fonction est maxi-

male car le signal n'a pas eu le temps de varier ; et pour un temps infini, elle est nulle car les deux signaux sont totalement dé-corrélés car la répartition des particules en solution a totalement changé. La vitesse à laquelle le signal perd sa corrélation est traduite par la vitesse à laquelle cette courbe décroit et elle est reliée à la vitesse de déplacement des particules. La taille des particules peut donc être déduite de la fonction d'autocorrélation du signal diffusé par l'échantillon.

Il se trouve qu'à cette diffraction, la diffusion s'ajoute. Le colloïde diffuse également de la lumière dans toutes les directions, mais de façon anisotrope en fonction de sa taille. Cela a pour conséquence que l'endroit où le photomultiplicateur est placé a en réalité un impact sur le rayon des particules mesurés, si la solution est polydisperse. En effet, à certains angles (petits angles entre le faisceau incident et la photomultiplicateur), un plus important signal proviendra des grandes particules et ces dernières seront surestimées. Cependant, dans le cas d'une solution parfaitement monodisperse, l'angle de mesure n'a pas d'influence sur le rayon mesuré.

Dans cette étude, nous nous plaçons toujours à 90° et dix mesures de dix secondes sont réalisées. Elles permettent l'acquisition de dix fonctions d'autocorrélation donc de dix distributions de taille. Ces dernières sont moyennées pour déterminer la taille des vésicules utilisées dans chaque expérience.

Annexe F

Cryo-microscopie électronique

La structure de la grille de microscopie électronique en transmission est constituée d'une grille régulière en cuivre. Sur cette structure est déposée une très fine couche de carbone amorphe, percée de trous.

La cryo-microscopie électronique en transmission inclut une étape de vitrification de l'échantillon dans un gaz ultra-froid - en général de l'éthane - pour fixer l'échantillon, et pouvoir l'observer dans son état natif. L'absence de coloration limite l'endommagement des échantillons.

Une goutte de solution (dans notre cas de liposomes à 3 mM en lipides) est déposée sur une grille. Après quelques secondes, le surplus de solution est absorbé par un papier filtre appliqué au dos de la grille, afin de se retrouver avec un très faible volume de solution. La grille est alors plongée très rapidement dans de l'éthane liquide (-160°C). La rapidité de la congélation permet de ne pas former de glace cristallisée mais uniquement de la glace vitreuse, pour avoir une bonne qualité d'image et éviter de former des cristaux de sels. La glace vitreuse, contenant les liposomes, est comme tendue entre les bords de ces trous. L'observation se fait donc en transmission, à travers ces trous. Le fait d'avoir absorbé l'excès de solution permet d'avoir une très faible épaisseur de glace, et donc un bon signal transmis à travers l'échantillon.

Une fois congelée, la grille est conservée dans de l'azote liquide jusqu'à son utilisation. Durant toute la suite, l'échantillon doit rester congelé ; les instruments sont donc tous refroidis avec de l'azote liquide. De plus, il faut prendre garde à ne pas soumettre l'échantillon à un environnement trop humide car de la glace pourrait ainsi se former sur la grille et nuirait à la qualité de la grille d'observation.

Pour l'observation, la grille est placée sur le porte-objet, dans le microscope électronique et irradié par des électrons. L'interaction entre les électrons et l'échantillon traversé dépend en particulier de sa densité, de sa nature chimique et de son épaisseur. Les différences spatiales de ces paramètres permettent la formation d'une image contrastée.

Annexe G

Estimation de la fraction de DOPE située dans le feuillet interne

Soit N le nombre total de lipides DOPE et n le nombre situé sur le feuillet externe, la composante de l'énergie de courbure du système provenant de celle du DOPE, E_n, dépend de la répartition du DOPE sur les deux feuillets, du fait de sa courbure spontanée négative, plus en accord avec celle du feuillet interne que du feuillet externe.

$E_n = 2\,\kappa\,a\left(n\,\left(\frac{1}{R}-c_0\right)^2+(N-n)\,\left(\frac{-1}{R}-c_0\right)^2\right)$ avec κ le module de courbure, a la surface occupée par un lipide, R le rayon du liposome et c_0 la courbure spontanée du DOPE.

$$E_n = 2\,\kappa\,a\,N\left(\frac{1}{R}+c_0\right)^2+2\,\kappa\,a\,n\left(\left(\frac{1}{R}-c_0\right)^2-\left(\frac{1}{R}+c_0\right)^2\right)$$

$$E_n = E_0+2\,\kappa\,a\,n\left(\frac{1}{R}-c_0-\frac{1}{R}-c_0\right)\left(\frac{1}{R}-c_0+\frac{1}{R}+c_0\right)\sim E_0-\frac{8\,\kappa\,a\,n\,c_0}{R}$$

Ainsi, $E_n \sim E_0 - n\,\alpha$, avec $\alpha = \frac{8\kappa\,a\,c_0}{R}$.

Maintenant que l'énergie est connue en fonction de n, il est possible de déterminer $<n>$ en fonction de la fonction de partition Z du système.

$$Z = \sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}e^{-\beta\,E_n} = \sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}e^{-\beta\,(E_0-n\,\alpha)} = Z_0\sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}e^{\beta\,n\,a}$$

Donc $\frac{Z}{Z_0} = \sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}e^{\beta\,n\,a} = \left(1+e^{\beta\,a}\right)^N$

Or $<n> = \frac{\sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}n\,e^{-\beta\,E_n}}{Z}$

Donc $<n> = \frac{\sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}n\,e^{\beta\,n\,a}}{\left(1+e^{\beta\,a}\right)^N} = \frac{\sum_{n=0}^{N}\binom{N}{n}\frac{1}{\beta}\frac{\partial}{\partial\,\alpha}\left(e^{\beta\,n\,a}\right)}{\left(1+e^{\beta\,a}\right)^N} = \frac{N\,e^{\beta\alpha}}{1+e^{\beta\alpha}}$

La fraction de DOPE qui se situe sur le feuillet interne (représentée en fonction du diamètre de la vésicule dans la Figure G.1) est définie par $\frac{N-n}{N} = \frac{1}{1+e^{\beta\alpha}}$.

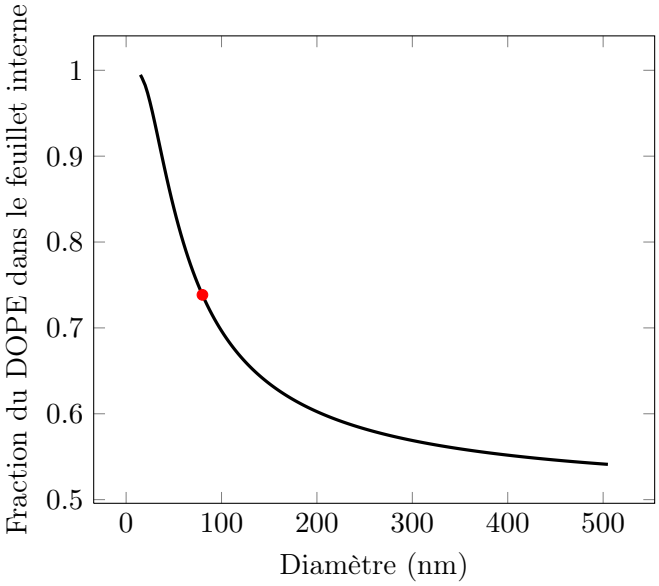


FIGURE G.1 – **Fraction du DOPE situé dans le feuillet interne en fonction du diamètre de la vésicule**. Pour un diamètre de 80 nm, environ 74% des DOPE sont situés sur le feuillet interne.

Elle vaut donc environ 74%, si l'on prend κ égal à 20 k_BT, c_0 valant -0,4 nm^{-1}, a égal à 0,65 nm^2, et R valant 40 nm.

Annexe H

Énergie d'activation de la fusion de MP_{int}-VS_{ext}

Nous avons vu, dans le Chapitre 1, que les membranes biologiques étaient asymétriques du point de vue de la répartition des lipides sur les deux feuillets [3]. De plus, il est souvent considéré que c'est la composition des feuillets *cis* qui influence majoritairement la fusion [104]. Nous avons donc décidé de mimer les feuillets cytoplasmiques de la vésicule synaptique (VS_{ext}) et de la membrane plasmique du neurone (MP_{int}), et de mesurer l'énergie d'activation de la fusion MP_{int}-VS_{ext}.

N'ayant aucune information sur la répartition du cholestérol, nous avons considéré qu'il était équitablement réparti entre les deux feuillets, aussi bien pour la vésicule synaptique que pour la membrane plasmique. Nous avons également estimé que toute la phosphatidylsérine était concentrée sur les feuillets cytoplasmiques et que ces derniers étaient totalement dépourvus de sphingomyéline, du fait des localisations habituelles de ces lipides *in vivo* [105].

Concernant VS_{ext}, la répartition du PE et des plasmalogènes-PE a été déterminée à partir des résultats de Michaelson *et al.* [106], qui ont étudié la répartition des différents types de lipides (tête polaire) sur les deux monocouches de la membrane, pour des vésicules synaptiques de raies. 77% du PE et 47% du Plasm-PE sont censés résider sur le feuillet externe de la vésicule. Les proportions respectives du cholestérol et du PE dans VS_{ext} ont été estimées en sachant que la vésicule synaptique est de faible taille (de l'ordre de 45 nm de diamètre) et que seulement environ 45% des lipides sont situés sur son feuillet interne. Les fractions des deux composants restants (POPC et DPPC) ont été choisies de façon à compléter VS_{ext}, leurs proportions relatives étant conservées par rapport à la composition globale de la vésicule synaptique. La composition lipidique qui a été choisie pour représenter le feuillet cytoplasmique de la vésicule (VS_{ext}) est reportée dans la Figure H.1.

Pour ce qui est de MP_{int}, nous nous sommes fondés sur l'étude de Quinn concernant les globules rouges [107] pour déterminer la répartition du PC et du PE. 75% du PE et 49% du PC résident sur le feuillet cytoplasmique de la membrane. De plus, nous avons considéré

que la PI était intégralement située sur le feuillet interne de la membrane, puisqu'elle y est très majoritairement localisée *in vivo* [108]. La composition choisie pour mimer le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique (MP_{int}) est reportée dans la Figure H.1.

Lipide	MP	MP_{int}
Cholestérol	50%	50%
Brain PC	20%	18%
Brain PE	12%	18%
Brain PIP2	2%	4%
Brain PS	5%	10 %
Brain SM	11%	0%

Lipide	VS	VS_{ext}
Cholestérol	33%	30%
POPC	16%	13%
18:0-22:6 PS	8%	14,5%
18:0-22:6 PE	11%	15,5%
18:0-20:4 PE	5,5%	7,5%
18(Pl):0-22:6 PE	9%	7,5%
18(Pl):0-20:4 PE	4,5%	4%
SM	4,5%	0%
DPPC	5,5%	5%
NBD-DOPE	1,5%	1,5%
Rh-DOPE	1,5%	1,5%

FIGURE H.1 – **Fractions des différents lipides pour MP, VS, MP_{int} et VS_{ext}.**

La mesure de l'énergie d'activation de la fusion des vésicules mimant les feuillets cytoplasmiques de la vésicule synaptique et de la membrane plasmique a donné une valeur de l'ordre de $27,4 \pm 1,6\, k_B T$, valeur qui est finalement très proche de celle obtenue pour la fusion MP-MP.

Le préfacteur d'Arrhenius vaut, quant à lui, 0,0097 (par rapport à 0,007 pour VS-MP et 0,53 pour MP-MP). La nucléation semble moins limitée dans le cas des vésicules mimant les feuillets cytoplasmiques de la vésicules synaptique et de la membrane plasmique. Néanmoins, il faudrait comparer ces résultats à une expérience de fusion MP_{int}-MP_{int} pour vraiment pouvoir tirer des conclusions concernant l'asymétrie.

Bibliographie

[1] A J Barber and G A Jamieson. Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *The Journal of biological chemistry*, 245(23) :6357–65, 1970.

[2] S J Singer and G L Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(23) :720–731, 1972.

[3] G van Meer. Lipid traffic in animal cells. *Annual review of cell biology*, 5 :247–275, 1989.

[4] M J Karnovsky, a M Kleinfeld, R L Hoover, and R D Klausner. The concept of lipid domains in membranes. *The Journal of cell biology*, 94(1) :1–6, 1982.

[5] K Simons and E Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633) :569–572, 1997.

[6] Allison D Dupuy and Donald M Engelman. Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8) :2848–2852, 2008.

[7] Shigeo Takamori, Matthew Holt, Katinka Stenius, Edward a Lemke, Mads Grønborg, Dietmar Riedel, Henning Urlaub, Stephan Schenck, Britta Brügger, Philippe Ringler, Shirley a Müller, Burkhard Rammner, Frauke Gräter, Jochen S Hub, Bert L De Groot, Gottfried Mieskes, Yoshinori Moriyama, Jürgen Klingauf, Helmut Grubmüller, John Heuser, Felix Wieland, and Reinhard Jahn. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4) :831–46, nov 2006.

[8] D. Chapman, R.M. Williams, and B.D. Ladbrooke. Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacylphosphatidylcholines (lecithins). *Chemistry and Physics of Lipids*, 1(5) :445–475, 1967.

[9] Ole G Mouritsen. *Life - as a matter of fat.* 2005.

[10] B Alberts, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, and P Walter. *Molecular Biology of the Cell.* 2002.

[11] B. K. Brandley and R.L. Schnaar. Cell-Surface Recognition Carbohydrates and Response in Cell. *Journal of Leukocyte Biology*, 111(2) :97–111, 1986.

[12] J Israelachvili. *Intermolecular and surface forces.* 1985.

[13] Siewert-Jan Marrink and Alan E Mark. Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophysical journal*, 87(6) :3894–900, dec 2004.

[14] Gerrit van Meer, Dennis R Voelker, and Gerald W Feigenson. Membrane lipids : where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2) :112–24, feb 2008.

[15] P Mueller, D O Rudin, H T Tien, and W C Wescott. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194 :979–980, 1962.

[16] Timothy H. Bayburt, Yelena V. Grinkova, and Stephen G. Sligar. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Letters*, 2(8) :853–856, 2002.

[17] L K Tamm and H M McConnell. Supported phospholipid bilayers. *Biophysical journal*, 47(1) :105–13, jan 1985.

[18] I. P. McCabe and M. B. Forstner. Polymer Supported Lipid Bialyers. *Open Journal of Biophysics*, 03(01) :59–69, 2013.

[19] C Tanford. The Hydrophobic effect. Formation of micelles and biological membranes. 1980.

[20] M M Kozlov, S L Leikin, L V Chernomordik, V S Markin, and Y A Chizmadzhev. Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents. *European Biophysics Journal*, 17 :121–129, 1989.

[21] D P Siegel. Energetics of intermediates in membrane fusion : comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophysical journal*, 65(5) :2124–40, nov 1993.

[22] P I Kuzmin, J Zimmerberg, Y a Chizmadzhev, and F S Cohen. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13) :7235–40, jun 2001.

[23] Vladislav S Markin and Joseph P Albanesi. Membrane fusion : stalk model revisited. *Biophysical journal*, 82(2) :693–712, feb 2002.

[24] Yonathan Kozlovsky and Michael M Kozlov. Stalk model of membrane fusion : solution of energy crisis. *Biophysical journal*, 82(2) :882–95, feb 2002.

[25] Yonathan Kozlovsky, Leonid V Chernomordik, and Michael M Kozlov. Lipid intermediates in membrane fusion : formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophysical journal*, 83(5) :2634–51, nov 2002.

[26] Sylvio May. Structure and energy of fusion stalks : the role of membrane edges. *Biophysical journal*, 83(6) :2969–2980, 2002.

[27] Yonathan Kozlovsky, Avishay Efrat, David P Siegel, David a Siegel, and Michael M Kozlov. Stalk phase formation : effects of dehydration and saddle splay modulus. *Biophysical journal*, 87(4) :2508–21, oct 2004.

[28] Marc Fuhrmans, Giovanni Marelli, Yuliya G. Smirnova, and Marcus Müller. Mechanics of membrane fusion/pore formation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 185 :109–128, 2015.

[29] T Weber, B V Zemelman, J a McNew, B Westermann, M Gmachl, F Parlati, T H Söllner, and J E Rothman. SNAREpins : minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6) :759–72, mar 1998.

[30] Yuliya G Smirnova, Siewert-Jan Marrink, Reinhard Lipowsky, and Volker Knecht. Solvent-exposed tails as prestalk transition states for membrane fusion at low hydration. *Journal of the American Chemical Society*, 132(19) :6710–8, may 2010.

[31] Shuhei Kawamoto and Wataru Shinoda. Free energy analysis along the stalk mechanism of membrane fusion. *Soft matter*, 10(17) :3048–54, apr 2014.

[32] Herre Jelger Risselada, Gregory Bubnis, and Helmut Grubmüller. Expansion of the fusion stalk and its implication for biological membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30) :1–6, 2014.

[33] M M Kozlov and V S Markin. A theory of osmotic lysis of lipid vesicles. *Journal of theoretical biology*, 109(1) :17–39, 1984.

[34] MM Kozlov and VS Markin. Possible mechanism of membrane fusion. *Biofizika*, 28(2) :242–47, 1983.

[35] V S Markin, M M Kozlov, and V L Borovjagin. On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *General physiology and biophysics*, 3(5) :361–77, oct 1984.

[36] W Helfrich. Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung*, 28 :693–703, 1973.

[37] Sol M Gruner. Stability of lyotropic phases with curved interfaces. *Journal of Physical Chemistry*, 93(22) :7562–7570, 1989.

[38] Siewert J Marrink, Alex H De Vries, and D Peter Tieleman. Lipids on the move : Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(1) :149–168, 2009.

[39] Q F Ahkong, D Fisher, W Tampion, and J A Lucy. Mechanisms of cell fusion. *Nature*, 253 :194–95, 1975.

[40] Leonid V Chernomordik and Michael M Kozlov. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual review of biochemistry*, 72 :175–207, jan 2003.

[41] E a Evans and V a Parsegian. Thermal-mechanical fluctuations enhance repulsion between bimolecular layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19) :7132–7136, 1986.

[42] R P Rand and V A Parsegian. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 988 :351–376, 1989.

[43] R P Rand. Interacting phospholipid bilayers : measured forces and induced structural changes. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 10 :277–314, 1981.

[44] R P Rand and V A Parsegian. Physical force considerations in model and biological membranes. *Canadian journal of biochemistryand cell biology*, 62 :752–59, 1984.

[45] Demetrios Papahadjopoulos, Shlomo Nir, and Nejat Dfizgfines. Molecular Mechanisms of Calcium-Induced Membrane Fusion. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(2) :157–179, 1990.

[46] D E Leckband, C a Helm, and J Israelachvili. Role of calcium in the adhesion and fusion of bilayers. *Biochemistry*, 32(4) :1127–40, feb 1993.

[47] Lin Yang and Huey W Huang. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5588) :1877–9, sep 2002.

[48] Weiming Xu, Jing Wang, James E Rothman, and Frédéric Pincet. Accelerating SNARE-Mediated Membrane Fusion by DNA – Lipid Tethers. *Angewandte Communications*, 54 :14388–14392, 2015.

[49] S L Leikin, M M Kozlov, L V Chernomordik, V S Markin, and Y a Chizmadzhev. Membrane fusion : overcoming of the hydration barrier and local restructuring. *Journal of theoretical biology*, 129(4) :411–25, dec 1987.

[50] Tanmay a M Bharat, Jörg Malsam, Wim J H Hagen, Andrea Scheutzow, Thomas H Söllner, and John a G Briggs. SNARE and regulatory proteins induce local membrane protrusions to prime docked vesicles for fast calcium-triggered fusion. *EMBO reports*, pages 1–7, feb 2014.

[51] A Chanturiya, E Leikina, J Zimmerberg, and L V Chernomordik. Short-chain alcohols promote an early stage of membrane hemifusion. *Biophysical journal*, 77(4) :2035–45, 1999.

[52] P K Kinnunen. Fusion of lipid bilayers : a model involving mechanistic connection to HII phase forming lipids. *Chemistry and physics of lipids*, 63(3) :251–258, 1992.

[53] Albert J Markvoort and Siewert J Marrink. *Lipid acrobatics in the membrane fusion arena.*, volume 68. Elsevier Inc., jan 2011.

[54] Mark J Stevens, Jan H Hoh, and Thomas B Woolf. Insights into the molecular mechanism of membrane fusion from simulation : evidence for the association of splayed tails. *Physical review letters*, 91(18) :188102, 2003.

[55] L Ginsberg and D Gingell. Problems in the physical interpretation of membrane interaction and fusion. *Cell Surface Reviews*, pages 791–833, 1978.

[56] S W Hui, T P Stewart, and L T Boni. Membrane fusion through point defects in bilayers. *Science*, 212(24) :921–923, 1981.

[57] L V Chernomordik, M M Kozlov, G B Melikyan, I G Abidor, V S Markin, and Y A Chizmadzhev. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 812 :643–655, 1985.

[58] M. Müller, K. Katsov, and M. Schick. New mechanism of membrane fusion. *The Journal of Chemical Physics*, 116(6) :2342–5, 2002.

[59] K. Katsov, M. Müller, and M. Schick. Field Theoretic Study of Bilayer Membrane Fusion. I. Hemifusion Mechanism. *Biophysical Journal*, 87(5) :3277–3290, 2004.

[60] Peter M Kasson, Nicholas W Kelley, Nina Singhal, Marija Vrljic, Axel T Brunger, and Vijay S Pande. Ensemble molecular dynamics yields submillisecond kinetics and

intermediates of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32) :11916–11921, 2006.

[61] Herre Jelger Risselada, Giovanni Marelli, Marc Fuhrmans, Yuliya G Smirnova, Helmut Grubmüller, Siewert J Marrink, and Marcus Müller. Line-Tension Controlled Mechanism for Influenza Fusion. *PLoS ONE*, 7(6) :1–14, 2012.

[62] L Chernomordik. Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chemistry and physics of lipids*, 81(2) :203–13, jul 1996.

[63] J.D. Litster. Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes. *Physics Letters A*, 53(3) :193–194, 1975.

[64] Da-Wei Li and Xiang Yang Liu. Examination of membrane fusion by dissipative particle dynamics simulation and comparison with continuum elastic models. *The Journal of Chemical Physics*, 122(17) :174909, 2005.

[65] A J Verkleij, C J A van Echteld, W J Gerritsen, P R Cullis, and B de Kruijff. The lipidic particle as an intermediate structure in membrane fusion processes and bilayer to hexagonal HII transitions. *Biochimica et biophysica acta*, 600(3) :620–4, aug 1980.

[66] L Chernomordik, Michael M Kozlov, and J Zimmerberg. Lipids in biological membrane fusion. *The Journal of Membrane Biology*, 146 :1–14, 1995.

[67] M. Pinot, S. Vanni, S. Pagnotta, S. Lacas-Gervais, L.-a. Payet, T. Ferreira, R. Gautier, B. Goud, B. Antonny, and H. Barelli. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science*, 345(6197) :693–697, aug 2014.

[68] T. V. Tolpekina, W. K. Den Otter, and W. J. Briels. Nucleation free energy of pore formation in an amphiphilic bilayer studied by molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 121(23) :12060–12066, 2004.

[69] S. Aeffner, T. Reusch, B. Weinhausen, and T. Salditt. Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25) :1609–1618, 2012.

[70] M J Clague, C Schoch, L Zech, and R Blumenthal. Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells : stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry*, 29(5) :1303–8, 1990.

[71] A F Oberhauser, J R Monck, and J M Fernandez. Events leading to the opening and closing of the exocytotic fusion pore have markedly different temperature dependencies. Kinetic analysis of single fusion events in patch-clamped mouse mast cells. *Biophysical Journal*, 61(3) :800–809, 1992.

[72] J Lee and B R Lentz. Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16) :9274–9, aug 1998.

[73] L Stryer and R P Haugland. Energy transfer : a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(2) :719–726, 1967.

[74] Bernard Kwok-Keung Fung and Lubert Stryer. Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer. *Biochemistry*, 17(24) :5241–5248, 1978.

[75] Hana Robson Marsden, Itsuro Tomatsu, and Alexander Kros. Model systems for membrane fusion. *Chemical Society reviews*, 40(3) :1572–1585, 2011.

[76] D K Struck, D Hoekstra, and R E Pagano. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, 20(14) :4093–9, jul 1981.

[77] Lei Shi, Qing-Tao Shen, Alexander Kiel, Jing Wang, Hong-Wei Wang, Thomas J Melia, James E Rothman, and Frédéric Pincet. SNARE proteins : one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6074) :1355–9, mar 2012.

[78] Minjoung Kyoung, Ankita Srivastava, Yunxiang Zhang, Jiajie Diao, and Marija Vrljic. In vitro system capable of differentiating fast Ca 2+ - triggered content mixing from lipid exchange for mechanistic studies of neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011.

[79] M Smolarsky, D Teitelbaum, M Sela, and C Gitler. A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposomes immune lysis. *Journal of Immunological Methods*, 15 :255–265, 1977.

[80] J C McIntyre and R G Sleight. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry*, 30(51) :11819–27, dec 1991.

[81] Jamie M Bergen, Ester J Kwon, Tammy W Shen, and Suzie H Pun. Application of an Environmentally-Sensitive Fluorophore for Rapid Analysis of the Binding and Internalization of Gene Carriers. *Bioconjugate Chemistry*, 19(1) :377–384, 2008.

[82] Paul Meers, Shaukat Ali, Ravi Erukulla, and Andrew S Janoff. Novel inner monolayer fusion assays reveal differential monolayer mixing associated with cation-dependent membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467 :227–243, 2000.

[83] Jiajie Diao, Rong Liu, Yueguang Rong, Minglei Zhao, Jing Zhang, Ying Lai, Qiangjun Zhou, Livia M. Wilz, Jianxu Li, Sandro Vivona, Richard a. Pfuetzner, Axel T. Brunger, and Qing Zhong. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 2015.

[84] Lukas Buehler. *Cell Membranes*. 2015.

[85] C Huang and J T Mason. Structure and properties of mixed-chain phospholipid assemblies. *Biochimica et biophysica acta*, 864(3-4) :423–470, 1986.

[86] B R Lentz, G F McIntyre, D J Parks, J C Yates, and D Massenburg. Bilayer curvature and certain amphipaths promote poly(ethylene glycol)-induced fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 31(10) :2643–2653, 1992.

[87] Sascha Martens, Michael M. Kozlov, and Harvey T. McMahon. How Synaptotagmin Promotes Membrane Fusion. *Science (New York, N.Y.)*, 316(May) :1205–1208, 2007.

[88] J Bentz, S Nir, and J Wilschut. Mass Action Kinetics of Vesicle Aggregation and Fusion. *Colloids and Surfaces*, 6 :333–363, 1983.

[89] M Minor and H P Van Leeuwen. Dynamics and kinetics. In *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, volume 4, pages 1–53. 2005.

[90] F J Martin and R C MacDonald. Phospholipid exchange between bilayer membrane vesicles. *Biochemistry*, 15(2) :321–327, 1976.

[91] Gabriele Duckwitz-Peterlein, Gert Eilenberger, and Peter Overath. Phospholipid exchange between bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 469 :311–325, 1977.

[92] M A Roseman and T E Thompson. Mechanism of the spontaneous transfer of phospholipids between bilayers. *Biochemistry*, 19(3) :439–444, 1980.

[93] J W Nichols and R E Pagano. Kinetics of soluble lipid monomer diffusion between vesicles. *Biochemistry*, 20(10) :2783–2789, 1981.

[94] J.M.H Kremer, M M Kops-Werkhoven, C Pathmamanoharan, O L J Gijzeman, and P H Wiersema. Phase diagrams and the kientics of phospholipid exchange for vesicles of different composition and radius. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 471 :177–188, 1977.

[95] F Parlati, T Weber, J a McNew, B Westermann, T H Söllner, and J E Rothman. Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22) :12565–12570, 1999.

[96] Feng Li, Frédéric Pincet, Eric Perez, William S Eng, Thomas J Melia, James E Rothman, and David Tareste. Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology*, 14(10) :890–6, oct 2007.

[97] Benjamin Kollmitzer, Peter Heftberger, Michael Rappolt, and Georg Pabst. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*, 9(45) :10877, 2013.

[98] E. Haque, T. J. McIntosh, and B. R. Lentz. Influence of lipid composition on physical properties and PEG-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles : "Nature's own" fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry*, 40(14) :4340–4348, 2001.

[99] F Olson, C. A. Hunt, F C Szoka, W. J. Vail, and D Papahadjopoulos. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 557 :9–23, 1979.

[100] M Hamm and M M Kozlov. Tilt model of inverted amphiphilic mesophases. *The European physical journal. B*, 6 :519–528, 1998.

[101] M Hamm and M M Kozlov. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *The European physical journal. B*, 3 :323–335, 2000.

[102] W Rawicz, K C Olbrich, T McIntosh, D Needham, and E Evans. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 79(1) :328–339, 2000.

[103] W Pfeiffer, Th Henkel, E Sackmann, W Knoll, and D Richter. Local Dynamics of Lipid Bilayers Studied by Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering. *Europhysics Letters (EPL)*, 8(2) :201–206, 1989.

[104] J W Deutsch and R B Kelly. Lipids of synaptic vesicles : relevance to the mechanism of membrane fusion. *Biochemistry*, 20(2) :378–385, 1981.

[105] Philippe F. Devaux and Roger Morris. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, 5(4) :241–246, 2004.

[106] D M Michaelson, G Barkai, and Y Barenholz. Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes. *The Biochemical journal*, 211(1) :155–162, 1983.

[107] Peter J Quinn. Plasma membrane phospholipid asymmetry. In *Phospholipid Metabolism in Apoptosis*, pages 39–60. 2004.

[108] Guillermo Mariño and Guido Kroemer. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell research*, 23(11) :1247–8, 2013.