

Thèse de doctorat de l'Université Paris 7 - Denis Diderot

U.F.R de Physique

Présentée par

Jean-Baptiste MANNEVILLE

Fluctuations de membranes actives

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris 7

Spécialité : physique des liquides

Soutenue le 21 Juin 1999 devant le jury composé de :

M.	F.	Gallet	Président
M.	J.	Prost	Directeur de thèse
Mme.	P.	Bassereau	Co-directeur de thèse
M.	R.	Bruinsma	Rapporteur
M.	B.	Fourcade	Rapporteur
M.	H.-G.	Döbereiner	Examinateur
M.	W.	Helfrich	Examinateur
M.	J.-L.	Rigaud	Examinateur

à Sandrine

Remerciements

Le travail présenté ici a été réalisé sous la direction de Jacques Prost et Patricia Bassereau, dans le laboratoire Physico-Chimie Curie, à l'Institut Curie.

Je voudrais remercier Jacques Prost pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions. Malgré ses nombreuses occupations, il a trouvé le temps de 'discuter science' avec moi. Il a non seulement guidé et encadré le travail théorique présenté ici, mais aussi suggéré de nombreuses idées d'expériences, tout en me laissant une très grande liberté dans le développement du projet. Patricia Bassereau a suivi mon travail au jour le jour et m'a aidé à résoudre tous les problèmes pratiques qu'un apprenti expérimentateur peut rencontrer, depuis les commandes de matériel jusqu'à l'interprétation des résultats expérimentaux, avec la gentillesse qui la caractérise. Je remercie encore ma double direction de thèse pour m'avoir confié un sujet aussi excitant sur lequel j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

Je tiens à remercier François Gallet de me faire l'honneur de présider le jury. Les discussions que nous avons pu avoir au cours de congrès par exemple ont toujours été très enrichissantes. Je remercie aussi Bertrand Fourcade et Robijn Bruinsma d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je leur suis très reconnaissant de l'intérêt qu'ils y ont porté et des corrections qu'ils m'ont amener à effectuer sur le manuscrit. Je remercie également Jean-Louis Rigaud d'avoir accepté de faire partie du jury, ainsi que Wolfgang Helfrich et Hans-Gunter Döbereiner de venir de si loin pour y participer.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ma thèse. En premier lieu, Daniel Lévy et Jean-Louis Rigaud qui m'ont fourni la bactériorhodopsine, appris à la manipuler et à la reconstituer dans des membranes lipidiques. Leur compétence dans le domaine et leur disponibilité m'ont été d'un grand secours. L'équipe d'Evan Evans à Vancouver (UBC, Vancouver, Canada) nous a divulgué tous les secrets des micropipettes : les conseils de Wislawa Rawicz, Ken Ritchie, Andrew Yeung et Evan Evans, puis ceux de Frédéric Pincet ont été très précieux. Je tiens aussi à remercier Vincent Croquette, David Bensimon, Ludovic Jullien, Charlie Gosse et Paul Chaikin avec lesquels nous avons envisagé d'appliquer le système expérimental décrit dans cette thèse à d'autres thématiques. L'équipe d'Adrian Parsegian à Bethesda (NIH, Bethesda, Etats-Unis) m'a accueilli lors d'une visite au cours de laquelle j'ai pu discuter avec Helmut Strey, Per Hansen et Adrian Parsegian. Enfin, l'enthousiasme d'Hans-Gunter Döbereiner au cours de nos nombreuses discussions et l'intérêt qu'il a porté au sujet de cette thèse dès les

débuts a permis d'entamer une collaboration très enrichissante. Je remercie aussi Anne-Laure Bernard et Marie-Alice Goudeau-Boudeville (Boubou), Isabelle Durand, Olivier Sandre, Sophie Cribier, Thierry Charitat et François Graner avec qui j'ai pu discuter directement de mon travail.

Un grand merci à tous les membres passés et présents du laboratoire PCC, qui ont tous contribué par leur avis, leurs conseils et leurs critiques, au travail présenté ici. Merci tout particulièrement à...

Fabien Gerbal, pour avoir partagé avec moi pendant ces quelques années le travail de thèse et d'enseignement. Je le remercie beaucoup pour son aide à mes débuts de moniteur et toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir.

François Waharte et Giovanna Fragneto avec qui j'ai partagé mon bureau et le Mac. Cohabiter avec des personnes aussi sympathiques a toujours été un plaisir.

Axel Buguin, Pascal Martin, Régis Fondecave et Georges Debrégeas (les anciens 'mouilleurs') et à Philippe Cluzel, Sophia Magnusdottir, Yvette Tran, Marie-Claude Faure, Magali Bonnier, Nicolas Cuvillier et Daniel Riveline, que j'ai cotoyés au début de ma thèse et qui assuraient une ambiance incomparable au labo.

Olivier Sandre, Arnaud Martin, Olivier Rossier et Laurent Bacri (les nouveaux 'mouilleurs') et à Olivia Du Rourre, Vincent Noireaux, Loïc Le Goff, Laurent Moreau, Cyril Colombo, Manuel Sickert, Benoit Ladoux, Andrea Parmeggiani, Sébastien Camale, Mathilde Badoual, Damien van Effenterre, Jacques Pécreaux et Reagan Bussy-Socrate qui sont bien partis pour assurer une ambiance au moins aussi bonne que la précédente.

Albrecht Ott et Jean-Louis Viovy pour m'avoir autorisé à piller leurs labos respectifs : en particulier, Albrecht Ott m'a prêté à maintes reprises du matériel indispensable au bon déroulement des expériences.

Emmanuel Farge, Frank Jülicher, Françoise Brochard, François Amblard et Pierre Nassoy pour leurs conseils avisés et les discussions intéressantes que nous avons pu avoir.

Michel Petit, Jean-Pierre Penolé, Jean-Hughes Codarbox et Patrick Suchet, qui travaillent dans l'ombre de l'atelier de mécanique ou d'électronique mais sans qui les expériences n'auraient pas pu être montées.

Jean-Gabriel Dick, Stéphane Tsacas, Mohamed Zitoun et François, l'équipe réseau informatique, pour leur compétence et secours d'urgence dans les moments difficiles.

Merci aussi aux étudiants que j'ai pu encadrer de près ou de loin au cours de cette thèse et qui m'ont beaucoup appris : Martin Prévost, Gwendal Josse, Wolfgang Eckärdt, Guillaume de Smedt et Jacques Pécreaux.

Je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements constants tout au long de cette thèse.

Enfin, je dédie ce travail à Sandrine. Ses questions et son regard de biologiste, souvent différent et parfois amusé, m'ont toujours apporté un éclairage nouveau. Elle a su me soutenir, m'aider, me conseiller et surtout me supporter : sa présence à mes côtés a transformé ces quelques années de thèse en véritable anniversaire de bonheur.

Table des matières

I Introduction	1
I.1 Physique des membranes	3
I.1.1 Description moléculaire d'une membrane	3
I.1.2 Fluctuations de forme d'une membrane lipidique	7
I.1.3 Dynamique d'une membrane fluctuante	20
I.2 Membranes biologiques	35
I.2.1 Composition des membranes biologiques	35
I.2.2 Modèle de la mosaïque fluide et dérivés	39
I.2.3 Activité des membranes biologiques	41
I.3 Vers un modèle physique de membrane cellulaire	51
I.3.1 Vésicules lipidiques à un composant	51
I.3.2 Vésicules lipidiques mixtes	67
I.3.3 Membranes polymérisées	77
I.3.4 Prise en compte des phénomènes hors-équilibre	85
II Théorie des membranes actives	91
II.1 Membrane libre	95
II.1.1 Modèle hydrodynamique	95
II.1.2 Modèle de loi d'échelle	102
II.2 Membrane en présence d'une paroi	111
II.2.1 Importance des termes non-linéaires	111
II.2.2 Effet d'amplification des fluctuations	113
II.2.3 Pression hors équilibre pour une membrane active	118

II.3 Modèles plus complets de membrane active	127
II.3.1 Membrane polymérisée	127
II.3.2 Effets électrostatiques	130
II.3.3 Couplage courbure-diffusion	132
II.4 Quelques ordres de grandeur et conséquences	137
II.4.1 Paramètres des modèles théoriques	137
II.4.2 Membrane libre	139
II.4.3 Membrane en présence d'une paroi	142
III Expériences	145
III.1 Modèle expérimental de membrane active	147
III.1.1 Description générale du modèle	147
III.1.2 Bactériorhodopsine	148
III.1.3 Reconstitution de la BR dans une membrane lipidique	156
III.1.4 Caractérisation du système	159
III.1.5 Quelques ordres de grandeur	169
III.2 Expériences de micropipettes	173
III.2.1 Principe et montage de la technique de micropipettes	173
III.2.2 Résultats	181
III.2.3 Interprétation et discussion	191
III.3 Améliorations possibles et perspectives	209
III.3.1 Vers une meilleure caractérisation du système	209
III.3.2 Technique de micropipettes	215
III.3.3 Techniques d'analyse spectrale	215
III.3.4 Autres exemples de membranes actives	216
IV Conclusions	219
A Milieux utilisés	225
A.1 Milieux fluorescents (pyranine)	226
A.2 Milieux contenant des ions K ⁺	228

TABLE DES MATIÈRES

v

A.3	Milieux contenant du glycérol	228
B	Electroformation de GUV	231
B.1	Préparation des lipides et de la bactériorhodopsine	231
B.2	Mélange lipides/BR	233
B.3	Dépôt sur les lames conductrices	234
B.4	Formation des GUVs sous champ électrique	234
C	BR fluorescente	237
C.1	Couplage BR-FITC	237
C.2	Rinçage de la BR et élimination de la fluorescence non couplée	238
D	Expériences de RICM	239
D.1	Principe	239
D.2	Premiers résultats	250
D.3	Interprétation et discussion	255
E	Transformation de Fourier rapide	259

Abreviations et notations utilisées

Notations et unités

r ou c	constante numérique (sans dimension)
v_{eau}	volume molaire de l'eau (m^3/mol)
q_e	charge élémentaire (C)
ϵ_w	constante diélectrique relative de l'eau (dans dimension)
λ_D	longueur de Debye (m)
kT	énergie thermique à la température T (J)
RT	énergie thermique molaire (J/mol)
N_a	nombre d'Avogadro (mol^{-1})
M	masse molaire (kg/mol)
e	épaisseur de la membrane (m)
a	'cut-off' microscopique, distance intermoléculaire (m)
χ	module de compressibilité (J/m^2)
μ	module de cisaillement (J/m^2)
ϖ	module de cisaillement renormalisé (J/m)
κ	module de courbure (J)
κ_G	module de courbure gaussienne (J)
$\bar{\kappa}$	module de courbure non locale (J)
\mathcal{H}	hamiltonien de Canham-Helfrich (J)
c	courbure (m^{-1})
σ	tension de la membrane (N/m)
A ou S	aire, surface (m^2)
L	taille latérale de la membrane (m)
α	excès de surface (sans dimension)
\mathbf{r}_-	vecteur position dans la représentation de Monge (m)
z	coordonnée verticale dans la représentation de Monge (m)
$u(\mathbf{r}_-, t)$	fluctuation de position au point \mathbf{r}_- , au temps t (m)
$\mathbf{n}(\mathbf{r}_-, t)$	vecteur normal à la membrane au point \mathbf{r}_- , au temps t (sans dimension)
q, \mathbf{q}_-, q_-	vecteur d'onde (m^{-1})

λ	longueur d'onde (m)
τ_m	temps de relaxation de la membrane (s)
ω	fréquence (s^{-1})
ξ_p	longueur de persistance (m)
η	viscosité du fluide (kg/m.s)
η_{mb}	viscosité de la membrane (kg/m.s)
\mathbf{v}	vitesse du fluide (m/s)
λ_p	coefficient de perméation ($\text{m}^3/\text{N.s}$)
f_{th}	force thermique par unité de surface (N/m ²)
\mathbf{f}_h	force thermique par unité de volume (N/m ³)
P	pression (Pa)
Π	pression osmotique (Pa)
$\mathbf{R}_j(t)$	position du jème centre actif au temps t (m)
f_a	force hors équilibre exercée par un centre actif par unité de surface (N/m ²)
F_a	force moyenne exercée par un centre actif (N)
D	coefficients de diffusion latérale d'un centre actif (m^2/s)
τ_D	temps de diffusion (s)
$I_0^{1/2}$	amplitude de la fonction d'autocorrélation (N)
τ	temps d'autocorrélation de la force hors équilibre (s)
ρ	densité des centres actifs (m^{-2})
$\bar{\rho}$	densité moyenne des centres actifs (m^{-2})
ξ_a	longueur caractéristique de l'activité (m)
Φ	flux de solvant traversant la membrane (m^3/s)
N_τ	nombre de coups (sans dimensions)
N_s	nombre de sites (sans dimensions)
τ_f	temps caractéristique de la force hors équilibre (s)
b	distance élémentaire (m)
Ξ	coefficient de couplage courbure-diffusion (J.m)
R_{ves}	rayon de la vésicule (m)
R_{pip}	rayon de la micropipette (m)
ΔP	pression appliquée dans les expériences de micropipettes (Pa)
ΔL	longueur de membrane aspirée dans la micropipette (m)
h	distance de séparation entre la membrane et la paroi (m)
d	distance moyenne de séparation entre la membrane et la paroi (m)
L_c	longueur de collision (m)
n	indice optique (sans dimension)
I	intensité lumineuse (W/m^2)
ϕ	déphasage (sans dimension)
V	potentiel d'interaction (J)

Abréviations

Chol	cholestérol
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PS	phosphatidylsérine
PG	phosphatidylglycérol
PI	phosphatidylinositol
SPM	sphingomyéline
DM	dimyristoyl
DL	dilauroyl
DS	distearoyl
DO	dioléoyl
DP	dipalmitoyl
EPC	<i>Egg PhosphatidylCholine</i> , phosphatidylcholine d'œuf
EPA	<i>Egg Phosphatidic Acid</i> , acide phosphatidique d'œuf
BR	bacteriorhodospine
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumine de serum bovin
FITC	<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i> , fluorescéine
MLV	<i>MultiLamellar Vesicle</i> , vésicule multilamellaire
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i> , ‘petite’ vésicule unilamellaire
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i> , ‘grande’ vésicule unilamellaire
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i> , vésicule unilamellaire ‘géante’
Ph	contraste de phase
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> , contraste interférentiel
RICM	<i>Reflection Interference Contrast Microscopy</i> , contraste interférentiel par réflexion
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
QENS	<i>QuasiElastic Neutron Scattering</i> , diffusion de neutrons
BLM	<i>Black Lipid Membrane</i> , film lipidique noir
ADE	<i>Area Difference Elasticity</i>

Avant-Propos

Depuis une trentaine d'années, les membranes lipidiques sont considérées comme des modèles pour l'étude des membranes biologiques. Comme les membranes des cellules vivantes, elles sont constituées d'une bicouche de molécules de lipides. La bicouche peut se refermer pour former une vésicule de forme sphérique ayant la même géométrie qu'une cellule biologique. De plus, dans le cas de vésicules dites 'géantes', la taille de la vésicule est comparable à celle d'une cellule. Toutes ces analogies ont permis de justifier l'utilisation des vésicules lipidiques comme modèles d'étude des propriétés physiques des membranes biologiques.

Les membranes biologiques sont évidemment des objets beaucoup plus complexes qu'une simple bicouche lipidique. Elles sont composées d'un mélange de différents types de lipides dans lequel diffusent des protéines. Du côté cytoplasmique, la membrane d'une cellule est couplée à un réseau de polymères appelé cytosquelette. Du côté extracellulaire, elle interagit avec l'extérieur par l'intermédiaire de glycoprotéines. Mais, d'un point de vue physique, la différence fondamentale entre une membrane lipidique modèle et une membrane biologique vient du fait que cette dernière n'est pas à l'équilibre thermodynamique. Les protéines transmembranaires des cellules biologiques exécutent en effet des fonctions qui nécessitent une consommation d'énergie. Ces fonctions s'effectuent via des réactions chimiques irréversibles et se traduisent par des flux d'ions et de solvant à travers la membrane ou par des échanges de matériel membranaire. La membrane d'une cellule est donc le siège de nombreux phénomènes hors équilibre : on la qualifiera de membrane 'active'.

Pour aboutir à une description physique complète des membranes biologiques, il est indispensable de tenir compte de leur nature hors équilibre. Jusqu'à présent, cet aspect n'a été que rarement considéré, tant sur le plan théorique que sur le plan expérimental. Un exemple simple où les phénomènes hors équilibre jouent un rôle important est celui des fluctuations de forme de la membrane. Sous l'effet de l'agitation thermique, une membrane 'passive', c'est-à-dire à l'équilibre thermodynamique, se déforme. Une membrane active, elle, subit des forces dues à l'activité hors équilibre qui s'ajoutent aux forces d'agitation thermique et modifient les fluctuations de forme. Nous nous sommes intéressés au problème particulier des fluctuations des membranes actives, dans le but plus général d'inclure les phénomènes hors équilibre dans la physique des membranes, étape nécessaire pour une description plus réaliste des membranes cellulaires.

Au cours de l'introduction (partie I), nous passerons en revue les travaux effectués sur les membranes fluctuantes à l'équilibre thermodynamique. Nous décrirons ensuite rapidement la complexité des membranes biologiques puis les différentes approches physiques utilisées pour modéliser leurs comportements. La partie II présente les résultats de différentes approches théoriques permettant de modéliser une membrane active fluctuante : ces modèles prévoient des effets importants de l'activité hors équilibre sur les fluctuations de forme d'une membrane. Enfin, nous montrerons à la partie III qu'un modèle expérimental simple de membrane active nous a permis de mettre en évidence un fort effet de l'activité sur les fluctuations.

Première partie

Introduction

Chapitre I.1

Physique des membranes

I.1.1 Description moléculaire d'une membrane

I.1.1.1 Quelques définitions

Une molécule amphiphile possède une partie hydrophile et une partie hydrophobe. A l'interface entre un milieu aqueux et un milieu non aqueux, la molécule s'oriente de manière à présenter sa partie hydrophile vers le milieu aqueux. C'est le cas par exemple à l'interface eau/air ou à l'interface eau/huile : la la partie hydrophile est tournée vers l'eau et la partie hydrophobe est tournée vers l'air ou l'huile. Lorsque plusieurs molécules amphiphiles sont en présence dans un milieu aqueux, les parties hydrophobes se regroupent pour minimiser leur contact avec l'eau. Cet auto-assemblage donne naissance à différentes géométries et topologies : monocouche, micelle, micelle inverse, micelle cylindrique, bicouche, vésicule, phase lamellaire, émulsion, émulsions bicontinues (ou phase éponge) (voir Fig. I.1.1).

Les lipides forment une catégorie particulière de molécules amphiphiles qui peuvent s'assembler pour former une bicouche appelée membrane lipidique. Une molécule de lipide est constituée d'une tête polaire hydrophile et d'une ou plusieurs (deux ou trois) chaînes hydrocarbonées hydrophobes de longueur variable (2 à 3 nm). L'épaisseur typique d'une bicouche lipidique est donc de $e \approx 5 - 7$ nm. La tête polaire définit le type de lipide. Il existe une grande diversité de lipides selon la longueur et l'insaturation des chaînes hydrocarbonées et selon la nature de la tête polaire. Les principales familles de lipides sont regroupées sur la figure I.1.2.

I.1.1.2 Aspects microscopiques de la bicouche lipidique

La membrane lipidique peut être décrite comme un fluide bidimensionnel isotrope au-dessus d'une température caractéristique des lipides. La distance intermoléculaire est de l'ordre de $a \approx 0.5$ nm. Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la membrane. Le coefficient de diffusion latérale des lipides dans la membrane a été déterminé par plu-

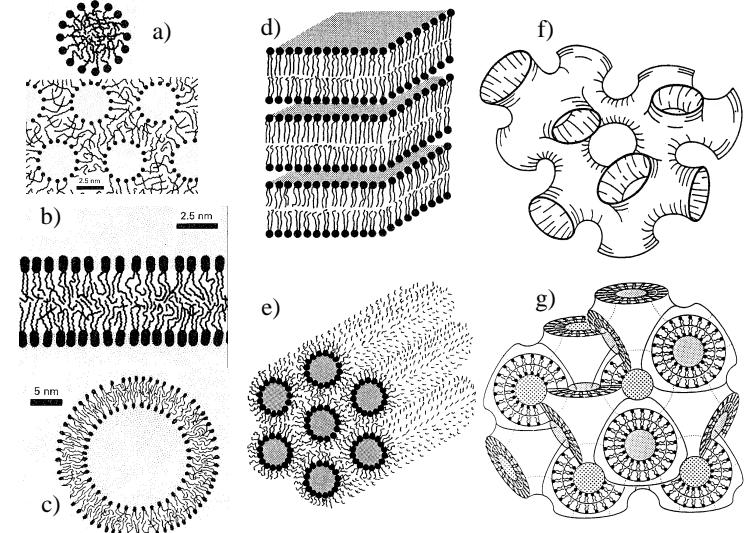


FIG. I.1.1: Quelques exemples de morphologies obtenues par auto-assemblage de molécules amphiphiles. a) Micelle et micelle inverse. b) Bicouche. c) Vésicule. d) Phase lamellaire formée d'un empilement de bicouches. e) Phase hexagonale inverse constituée de micelles cylindriques inverses. f) Phase éponge. g) Phase cubique inverse bicontinue (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a] et [Israelachvili, 1992]).

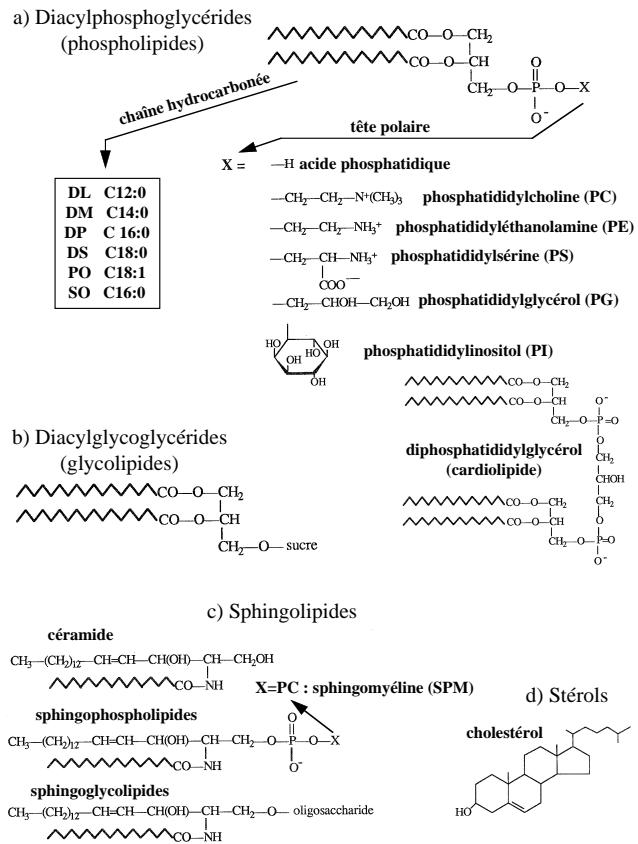


FIG. I.1.2: Principales familles de lipides. a) Phosphoglycérides (phospholipides). b) Diacylglycoglycérides (glycolipides). c) Sphingolipides. d) Stérols. La notation $C_n:m$ désigne le nombre n d'atomes de carbone et le nombre m d'insaturations dans la chaîne (d'après [Shechter, 1993]).

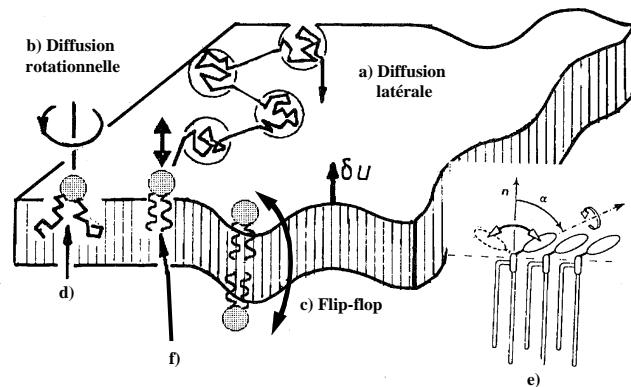


FIG. I.1.3: Principaux comportements dynamiques microscopiques des lipides dans une bicouche.
a) Diffusion latérale. b) Diffusion rotationnelle. c) 'Flip-flop'. d) Mouvements des chaînes hydrocarbonées. e) Mouvements des têtes polaires. f) Mouvement de vibration hors du plan de la membrane (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

sieurs méthodes : par la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 305], [Shechter, 1993, p. 123], par diffusion de neutrons (QENS : *Quasi Elastic Neutron Scattering*) [König et al., 1992], ou encore par une technique plus récente de spectroscopie haute-fréquence [Haibel et al., 1998] : il est de l'ordre de $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ et sa valeur précise dépend du type de lipides étudié. Les molécules de lipides peuvent aussi tourner sur elles-mêmes avec un coefficient de diffusion rotationnel de $D_r = 10^8 \text{ s}^{-1}$ [Baeriswyl, 1987], [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 239]. Enfin, elles peuvent aussi passer d'un feuillett à l'autre de la bicouche : le temps caractéristique de ce phénomène de bascule ('flip-flop') est néanmoins beaucoup plus lent, de l'ordre de $D_f = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ [Alberts et al., 1994]. La figure I.1.3 résume les principaux comportements dynamiques microscopiques des lipides dans une membrane.

Lorsqu'on abaisse la température, une transition de phase du premier ordre se produit vers une phase ordonnée de type cristal liquide et le coefficient de diffusion latérale des lipides chute ($D = 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$) [Shechter, 1993, p. 123]. Cette transition a été étudiée en détail. La température de transition dépend du type de lipides. Plus les lipides sont désordonnés (chaînes carbonées courtes ou insaturées) plus la température de transition est basse. La présence d'impuretés ou de défauts dans la membrane diminue aussi la température de transition.

La morphologie de la membrane obtenue après auto-assemblage dépend fortement des conditions expérimentales : la structure thermodynamiquement stable constituée de bicouches est la phase lamellaire ; la phase vésicule, obtenue quand la bicouche se referme sur elle-même, est quant à elle métastable [Safran, 1994, chp 8]. La forme géométrique de la molécule de lipide conditionne

la courbure de la membrane. L'assemblage de molécules de forme cylindrique donne naissance à une bicouche plane sans courbure locale, alors qu'une bicouche assemblée à partir de molécules coniques possède une courbure appelée courbure spontanée et notée c_0 (voir Fig. I.1.4). Dans le cas de vésicules, la courbure de la membrane est imposée par la géométrie sphérique : $c = 1/R$ où R est le rayon de la vésicule. La forme géométrique du lipide utilisé est plus ou moins bien adaptée à la courbure c de la vésicule et conditionne donc la formation et la stabilité de vésicules d'une taille donnée. Enfin, toujours à cause de la courbure, il existe une dissymétrie entre les deux monocouches constituant la membrane : la surface du feuillet interne de la vésicule est légèrement plus faible que celle du feuillet externe, donc le feuillet interne est plus courbé que le feuillet externe.

I.1.2 Fluctuations de forme d'une membrane lipidique

I.1.2.1 Energie élastique d'une membrane

Si on se place d'un point de vue plus macroscopique, c'est-à-dire à des échelles de longueur grandes devant la taille des molécules, la membrane lipidique apparaît comme un objet bidimensionnel aux propriétés mécaniques très particulières. Ces propriétés macroscopiques sont, bien entendu, liées à la structure microscopique de la bicouche décrite à la section précédente.

La bicouche lipidique est élastique et peut être déformée de trois manières différentes : par extension-compression, par cisaillement ou par courbure (Fig. I.1.5). Une déformation quelconque est la combinaison de ces trois types de déformations élémentaires, qui font chacune partie de classes de symétries différentes : déformation isotrope pour l'extension-compression, déformation à surface constante pour le cisaillement et déformation perpendiculaire au plan de la membrane pour la courbure. A chacune de ces trois déformations est associée une énergie (voir pour revue [Duwe et al., 1989, Sackmann, 1989]).

L'énergie d'extension-compression (par unité de surface de membrane) H_{ext} dépend du changement relatif de surface $\Delta A/A$ de manière quadratique :

$$H_{ext} = \frac{1}{2}\chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2,$$

où χ est le module de compressibilité (en J/m^2).

L'énergie de cisaillement doit être prise en compte dans le cas de membrane cristalline ou polymérisée, alors que le cisaillement d'une membrane en phase fluide ne coûte qu'une énergie négligeable. L'énergie associée au cisaillement pur (par unité de surface de membrane) est donnée par :

$$H_{cis} = \frac{1}{2}\mu(\tilde{\lambda}^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2),$$

où $\tilde{\lambda} = (L_0 + \Delta L)/L_0$ est le taux d'extension latérale et μ est le module de cisaillement (en J/m^2). Dans la suite, le module de cisaillement μ ne nous concernera pas car nous nous intéresserons

Forme géométrique	Structures formées
Cone	Micelle sphérique
Cone tronqué	Micelle cylindrique
Cone tronqué	Bicouche flexible, vésicules
Cylindre	Planar bilayers
Cone inversé	Micelle inverse

FIG. I.1.4: Relation entre la forme géométrique moyenne des molécules amphiphiles et la structure obtenue après auto-assemblage (d'après [Israelachvili, 1992]). Pour les lipides, on obtient en général des bicouches planes ou courbées.

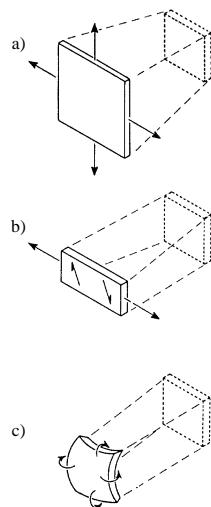


FIG. I.1.5: Représentation schématique des trois modes de déformations indépendants d'une membrane. a) Extension-compression. b) Cisaillement pur. c) Courbure. Les flèches représentent le sens des déformations (d'après [Evans and Needham, 1987]).

Matériau	Module de compressibilité χ (J/m ²)	Module de cisaillement μ (en J/m ²)	Module de courbure κ (en J)
Acier	100	1×10^2	1×10^{-15}
Polyéthylène	5	5	5×10^{-17}
Globule Rouge	10×10^{-6}	6×10^{-6}	$2 - 70 \times 10^{-20}$
Bicouche lipidique	$100 - 700 \times 10^{-3}$	0	$4 - 40 \times 10^{-20}$

TAB. I.1.1: Valeurs des trois modules élastiques χ , μ , κ pour différents matériaux (d'après [Sackmann, 1994]).

uniquement à des membranes en phase fluide, à l'exception du cas des membranes polymérisées (voir §I.3.3).

Enfin, la courbure c de la membrane contribue à l'énergie (par unité de surface de membrane) par :

$$H_{courb} = \frac{1}{2}\kappa(c - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2,$$

où $c = c_1 + c_2$ est la courbure moyenne de la membrane avec $c_1 = 1/R_1$ et $c_2 = 1/R_2$ les deux courbures principales de la membrane, où c_0 est la courbure spontanée, et où le produit $c_1 c_2$ est la courbure gaussienne. κ est le module de courbure ou rigidité (en J) et κ_G est le module de courbure gaussienne (en J). La courbure gaussienne introduit un terme constant qui ne dépend que du genre topologique de la surface (théorème de Gauss-Bonnet). Le terme de courbure gaussienne ne sera pris en compte que si la topologie de la membrane peut changer.

L'énergie élastique (par unité de surface) de la membrane est donc donnée par :

$$H = H_{ext} + H_{cis} + H_{courb} = \frac{1}{2}\chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 + \frac{1}{2}\mu(\lambda^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2) + \frac{1}{2}\kappa(c - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2. \quad (\text{I.1.1})$$

Les trois modules χ, μ, κ sont des modules élastiques bidimensionnels. Le tableau I.1.1 donne quelques ordres de grandeur de ces modules pour différents matériaux.

Un dernier paramètre macroscopique important pour la description théorique d'une membrane lipidique est sa tension latérale σ . Si on 'tire' sur la membrane en exerçant une force extérieure, la surface totale de la membrane varie et on met la membrane sous tension. Il existe donc une relation entre la variation de surface de la membrane et sa tension de surface. Lorsque la surface d'une membrane sous tension varie de ΔA , l'énergie libre de la membrane augmente de $\sigma\Delta A$. On retrouve la définition classique de la tension de surface : $\sigma = \partial F / \partial A$, où F est l'énergie libre de la membrane. On peut donc introduire un terme d'énergie par unité de surface lié à la variation de surface pour une membrane tendue :

$$H_{tens} = \sigma \frac{\Delta A}{A}.$$

Avec les notations précédentes, la tension est définie par : $\sigma = \partial(HA)/\partial(\Delta A)$. On trouve donc $\sigma = \chi\Delta A/A$. En fait, à cause des fluctuations, l'expression complète de la variation de la tension en fonction de l'étirement $\alpha = \Delta A/A$ n'est pas si simple et fait intervenir les deux modules élastiques χ et κ . On reviendra sur ce point par la suite (voir Eq. I.1.11). Pour finir, deux cas particuliers vont nous intéresser dans la suite : celui d'une membrane sans tension ($\sigma = 0$) et celui d'une membrane très faiblement tendue $\sigma \rightarrow 0$.

Malgré l'aspect très macroscopique de la description ci-dessus, il faut garder présent à l'esprit que ce sont les propriétés microscopiques des lipides qui confèrent à la bicoche ses caractéristiques élastiques. Les aspects microscopiques ne sont pas pris en compte dans la plupart des modèles théoriques développés jusqu'à maintenant, et sont plus facilement traités par simulations numériques, simulations de dynamique moléculaire ou simulations de Monte-Carlo [Fattal and Ben-Shaul, 1994; Damodaran and Merz, 1994].

I.1.2.2 Fluctuations thermiques et conséquences

Hamiltonien de Canham-Helfrich

La bicoche lipidique étant de faible épaisseur ($e \simeq 5 - 7$ nm), elle est soumise à l'agitation thermique : les chocs des molécules d'eau du solvant déforment une membrane initialement plane en créant des ondulations de la surface. Au cours du temps, la position d'un point donné de la membrane fluctue donc autour de sa position moyenne. L'énergie transférée à la membrane par le mouvement brownien des molécules d'eau est de l'ordre de kT , où k est la constante de Boltzmann et T la température absolue. C'est cette énergie thermique qui est à l'origine des fluctuations observées, d'où le nom de 'fluctuations thermiques'.

Pour décrire une membrane plane de surface $A = L^2$ fluctuant autour de son plan moyen, on utilise la représentation de Monge. Dans un système de coordonnées cartésiennes (x, y, z) de vecteurs unitaires $(\mathbf{i}, \mathbf{j}, \mathbf{k})$, le plan moyen de la membrane est situé en $z = 0$. On note $u(x, y, t)$ l'amplitude de la fluctuation au point (x, y) au temps t , c'est-à-dire la position de la membrane par rapport à son plan moyen au point (x, y) au temps t (voir Fig. I.1.6). Une membrane fluctue à toutes les échelles de longueur. Ce froissage à toutes les échelles est schématisé sur la figure I.1.7. L'amplitude minimale des fluctuations est déterminée par la distance entre les molécules constituant la membrane ('cut-off' moléculaire a) et l'amplitude maximale est donnée par la taille L de la membrane étudiée. De la même façon, la longueur d'onde λ d'un mode de fluctuation donné est limitée par $a < \lambda < L$ et le vecteur d'onde q correspondant par $2\pi/L < q < 2\pi/a$. Un cas particulier intéressant sur le plan théorique est celui d'une membrane infinie ; on a alors $L \rightarrow \infty$ et on peut s'intéresser à la limite des grandes longueurs d'onde $\lambda \rightarrow \infty$, ou de façon équivalente à la limite des petits vecteurs d'onde $q \rightarrow 0$.

L'énergie totale d'une membrane fluide fluctuante est dominée par deux termes : le terme d'énergie de courbure H_{courb} et le terme de tension H_{tens} [Brochard and Lennon, 1975,

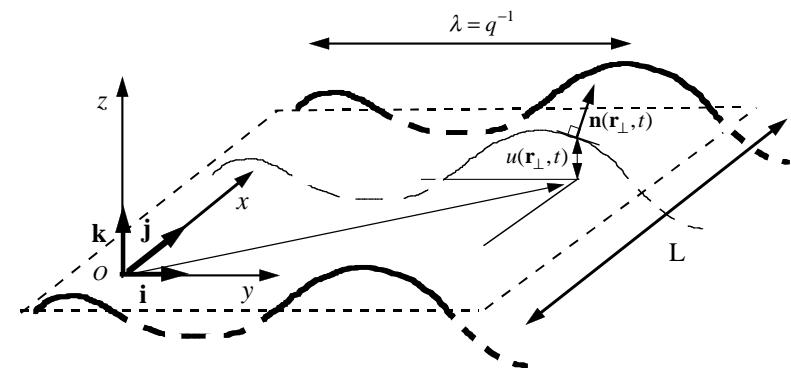


FIG. I.1.6: Représentation de Monge d'une membrane fluctuante de taille $L \times L$. $u(\mathbf{r}_\perp, t)$ représente la fluctuation de position de la membrane par rapport au plan moyen au point (x, y) et au temps t . Le vecteur normal à la membrane est noté $\mathbf{n}(\mathbf{r}_\perp, t)$.

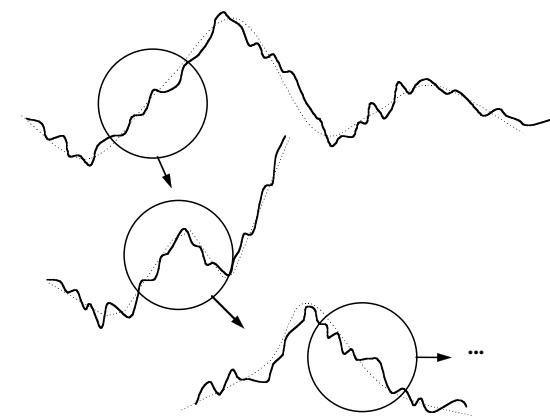


FIG. I.1.7: Schéma d'une membrane fluctuante représentant les fluctuations de forme à toutes les échelles de longueur.

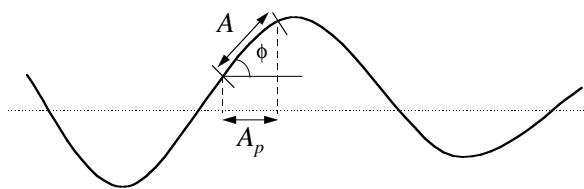


FIG. I.1.8: Aire réelle et aire projetée de la membrane.

Brochard et al., 1976]. On montre à l'aide d'arguments géométriques [Helfrich, 1973] que la courbure locale de la membrane est $c = 1/R_1 + 1/R_2 = (\nabla^2 u)^2$. L'expression complète de l'énergie de courbure H_{courb} inclut un terme de courbure spontanée c_0 et un terme de courbure gaussienne $c_1 c_2$ (voir Eq. I.1.1). Dans les problèmes étudiés par la suite, la courbure spontanée comme la courbure gaussienne ne joueront aucun rôle, car on supposera que les molécules sont de forme symétrique et que la membrane ne change pas de topologie.

On peut, toujours par des arguments géométriques, exprimer le terme de tension $H_{tens} = \sigma \Delta A / A$ à l'aide de u [Helfrich and Servuss, 1984; Peterson, 1985b]. En effet, si on note ϕ l'angle entre la verticale et la normale à la membrane en (x, y) , l'aire réelle de la membrane A se projette sur le plan (x, y) en une aire projetée $A_p = A \cos \phi$ (voir Fig. I.1.8). Il apparaît donc un excès de surface à cause des fluctuations :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{A - A_p}{A} = 1 - \cos \phi \simeq \frac{\phi^2}{2} \simeq \frac{(\nabla u)^2}{2}. \quad (\text{I.1.2})$$

Dans ce modèle, dit ‘modèle de courbure’ (*curvature model*), l'énergie totale d'une membrane fluctuante est donc donnée par [Canham, 1970; Helfrich, 1973; Evans, 1973; Evans, 1974] :

$$\mathcal{H} = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 \right] dS. \quad (\text{I.1.3})$$

\mathcal{H} est appelé hamiltonien de Canham-Helfrich : il fait intervenir le module de courbure κ et la tension latérale σ , ainsi qu'un développement en puissance de u à l'ordre 2 (approximation harmonique). Rappelons les hypothèses utilisées dans l'équation I.1.3 : la membrane étudiée est en phase fluide donc le cisaillement est négligeable, les molécules lipidiques symétriques donc la courbure spontanée est nulle, et on ne considère aucun changement de topologie donc la courbure gaussienne n'intervient pas. D'après le tableau I.1.1, le module de courbure d'une bicoche lipidique est de l'ordre de $10 - 20 kT$ (l'énergie thermique à 300°K est $kT = 4.1 \times 10^{-21} \text{ J}$). La tension latérale varie en fonction des forces extérieures appliquées à la membrane, mais est typiquement de l'ordre de $10^{-6} - 10^{-5} \text{ J/m}^2$.

Pour finir, notons que le ‘modèle de courbure’ présenté ici reste très macroscopique et prend en compte des modes de courbure globale. Helfrich a proposé récemment un modèle théorique plus microscopique appelé ‘modèle de pointes’ (*hat model*) utilisant des modes de courbure locale [Helfrich, 1989; Helfrich and Kozlov, 1994]. Les propriétés élastiques de la membrane lipidique

peuvent aussi être déduites des interactions hydrophobes microscopiques à l'aide de théories moléculaires [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 359]. Dans la suite, nous utiliserons principalement le ‘modèle de courbure’ et reviendrons brièvement sur les aspects microscopiques au paragraphe §I.1.3.3.

Spectre de fluctuations

Pour plus de facilité de calcul, on travaille généralement dans l'espace réciproque en introduisant la transformée de Fourier de $u(x, y, t) = u(\mathbf{r}_-, t)$ (où \mathbf{r}_- est le vecteur position bidimensionnel de coordonnées x et y) notée $u(q_x, q_y, t) = u(\mathbf{q}_-, t)$ (où \mathbf{q}_- est le vecteur d'onde bidimensionnel de coordonnées q_x et q_y) et définie par :

$$u(\mathbf{q}_-, t) = \frac{1}{\sqrt{A}} \iint u(\mathbf{r}_-, t) \exp(i\mathbf{q}_- \cdot \mathbf{r}_-) d^2 \mathbf{r}_- \\ u(\mathbf{r}_-, t) = \frac{\sqrt{A}}{(2\pi)^2} \iint u(\mathbf{q}_-, t) \exp(-i\mathbf{q}_- \cdot \mathbf{r}_-) d^2 \mathbf{q}_-. \quad (\text{I.1.4})$$

On utilise la même notation pour u et pour sa transformée de Fourier, l'ambiguïté étant levée de façon évidente par l'argument de u . Cette définition de la transformée de Fourier (Eq. I.1.4) sera utilisée dans la suite de cette section et dans la partie théorique : elle présente l'avantage de ne pas faire intervenir la surface A de la membrane considérée dans le spectre de fluctuations.

La source de bruit pour les fluctuations est thermique. Le théorème d'équipartition de l'énergie peut donc être appliqué : $\langle \mathcal{H} \rangle = \frac{1}{2} kT$ pour un mode de vecteur d'onde donné q , où $\langle \rangle$ désigne la moyenne statistique. On en déduit facilement le spectre de fluctuations, défini comme le carré moyen de l'amplitude des fluctuations :

$$\langle u(q_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2}. \quad (\text{I.1.5})$$

On peut remarquer qu'aucun paramètre dynamique, comme par exemple la viscosité du milieu entourant la membrane, n'intervient. C'est une conséquence directe du théorème d'équipartition de l'énergie, valable à l'équilibre thermodynamique et appliquée ici puisque les fluctuations sont d'origine thermique.

La forme de l'équation I.1.5 montre que deux régimes de fluctuation existent en fonction de q : un régime dominé par la tension aux petits vecteurs d'onde $q \ll q_c$ et un régime dominé par la courbure si $q \gg q_c$ avec $q_c = \sqrt{\sigma/\kappa}$.

Dans le régime dominé par la courbure, ou bien pour une membrane sans tension ($\sigma = 0$), on peut facilement donner un ordre de grandeur de l'amplitude maximale des fluctuations thermiques dans l'espace réel en intégrant l'équation I.1.5 entre $q_{min} = 2\pi/L$ et $q_{max} = 2\pi/a$. On trouve :

$$\langle u(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{kT}{\kappa}} L. \quad (\text{I.1.6})$$

Pour une membrane formée de molécules amphiphiles à une seule chaîne, on a typiquement $\kappa \simeq kT$ et on trouve : $\langle u(L) \rangle \simeq L$. L'amplitude maximale des fluctuations thermiques d'une

membrane sans tension est donc de l'ordre de la taille de la membrane. Pour une membrane lipidique, on a $L = 10 \mu\text{m}$ et $\kappa = 10 kT$: on trouve $\langle u(L) \rangle = 3 \mu\text{m}$.

Dans le régime dominé par la tension, les mêmes arguments donnent :

$$\langle u(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{kT}{\sigma} \ln \frac{L}{a}} \quad (\text{I.1.7})$$

Avec $\sigma = 10^{-5} \text{ J/m}^2$, $a = 0.5 \text{ nm}$, et $L = 10 \mu\text{m}$, on trouve $\langle u(L) \rangle = 0.06 \mu\text{m}$. L'amplitude des fluctuations est donc considérablement réduite pour une membrane tendue.

Longueur de persistance

La longueur de persistance ξ_p est la distance au-delà de la laquelle les fluctuations d'orientation du vecteur normal à la membrane (défini sur la figure I.1.6) ne sont plus corrélées. A des échelles petites devant ξ_p , la membrane apparaît rigide, alors qu'elle paraît plus flexible et froissée (*crumpled*) à des échelles plus grandes que ξ_p . Pour la calculer, on impose que les fluctuations du vecteur $\mathbf{n}(x, y, t)$ normal à la membrane en x, y soient d'ordre 1 [de Gennes and Taupin, 1982]. Par des arguments géométriques, on montre la relation suivante entre la fluctuation du vecteur normal $\delta\mathbf{n}$ et la fluctuation de position u : $|\delta\mathbf{n}(\mathbf{q}_-)|^2 = q_-^2(u(\mathbf{q}_-))^2$. En intégrant cette relation entre $q_{min} = 2\pi/\xi_p$ et $q_{max} = 2\pi/a$:

$$\begin{aligned} \langle |\delta\mathbf{n}|^2 \rangle &= \int_{2\pi/\xi_p}^{2\pi/a} \langle |\delta\mathbf{n}(\mathbf{q}_-)|^2 \rangle \frac{d^2\mathbf{q}_-}{(2\pi)^2} \\ &= \int_{2\pi/\xi_p}^{2\pi/a} q_-^2 \langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle 2\pi q_- \frac{dq_-}{(2\pi)^2} \\ &\simeq 1, \end{aligned} \quad (\text{I.1.8})$$

et en utilisant l'équation I.1.5 pour une membrane sans tension, on trouve une longueur de persistance de :

$$\xi_p = a \exp \frac{2\pi\kappa}{kT} \quad (\text{I.1.9})$$

Pour une rigidité de $\kappa = 10 kT$, on trouve une longueur de persistance très grande, de l'ordre de $\xi_p \simeq 10^{18} \text{ m}$.

Excès de surface dû aux fluctuations

Comme on l'a vu précédemment (Eq. I.1.2), l'aire projetée sur le plan (x, y) est inférieure à l'aire réelle de la membrane (voir Fig. I.1.8) : on a un excès de surface par mode q égal à $\alpha_q = \Delta A/A_q = (\nabla_- u)^2/2$. En utilisant l'équation I.1.5 et en intégrant sur tous les modes de fluctuations q , on peut calculer l'excès de surface total dû aux fluctuations [Helfrich and Servuss, 1984] :

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\pi^2/a^2 + \sigma/\kappa}{\pi^2/L^2 + \sigma/\kappa}. \quad (\text{I.1.10})$$

Pour une membrane sans tension, on a donc :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{4\pi\kappa} \ln \frac{L}{a}.$$

Avec $L \simeq 10 \mu\text{m}$, $a \simeq 0.5 \text{ nm}$ et $\kappa = 10 kT$, on trouve un excès de surface stocké dans les fluctuations d'une membrane sans tension de $\Delta A/A = 8\%$.

Pour une membrane tendue, en utilisant les ordres de grandeur donnés précédemment (p. 13), on remarque que $\kappa\pi^2/L^2 \ll \sigma \ll \kappa\pi^2/a^2$. On trouve :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\kappa\pi^2}{\sigma a^2}.$$

Pour une tension $\sigma = 10^{-5} \text{ J/m}^2$, on obtient un excès de surface de : $\Delta A/A = 5\%$. Pour une extension purement élastique de la membrane, on a vu précédemment que $\sigma = \chi\Delta A/A$. Si on ajoute un excès de surface purement élastique à l'excès de surface dû aux fluctuations, on trouve la relation complète entre $\Delta A/A$ et σ ci-dessous :

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\kappa\pi^2}{\sigma a^2} + \frac{\sigma}{\chi}. \quad (\text{I.1.11})$$

On voit donc que, si on 'tire' sur une membrane fluctuante peu tendue en augmentant progressivement sa tension, on commence par 'déplier' ses fluctuations, puisque le terme logarithmique représentant l'excès de surface dû aux fluctuations domine si σ est petit, puis on l'étire élastiquement, car le terme linéaire domine si la tension augmente.

Renormalisation du module de courbure et de la tension par les fluctuations

Comme on vient de le voir, une membrane fluctuante possède un excès de surface dû aux fluctuations. Ses propriétés élastiques vont elles aussi être modifiées par la présence des fluctuations. On s'attend donc à ce que les paramètres κ et σ qui interviennent dans le hamiltonien (Eq. I.1.3) soient renormalisés sous l'effet des fluctuations. Puisque l'amplitude des fluctuations dépend du vecteur d'onde q , on s'attend aussi à ce que les valeurs des paramètres renormalisés κ_{eff} et σ_{eff} dépendent de q , donc de l'échelle à laquelle on étudie les fluctuations $l \propto 1/q$ et donc de la taille L de la membrane étudiée. Ce sont ces paramètres renormalisés κ_{eff} et σ_{eff} qui sont observables macroscopiquement.

Le module de courbure renormalisé κ_{eff} est de la forme :

$$\kappa_{eff} = \kappa - r \frac{kT}{4\pi} \ln \frac{L}{a}, \quad (\text{I.1.12})$$

où r est un coefficient numérique dont la valeur dépend des méthodes de calcul utilisées. La valeur $r = 3$ est obtenue par des calculs de groupe de renormalisation [Peliti and Leibler, 1985, Förster, 1986] et a été confirmée récemment par des simulations numériques de Monte-Carlo [Gompper and Kroll, 1995, Gompper and Kroll, 1996]. Par des arguments plus géométriques, comme ceux utilisés plus haut pour l'excès de surface dû aux fluctuations, Helfrich trouve $r = 1$

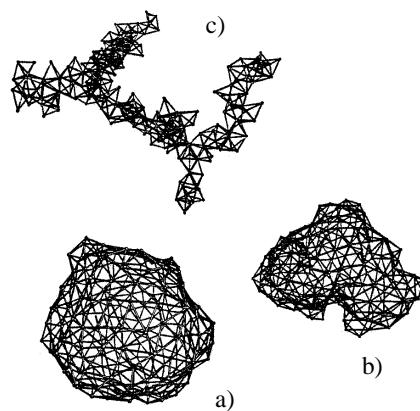


FIG. I.1.9: Simulation numérique de la transition de froissage d'une membrane fluide lorsque $\kappa \rightarrow 0$. a) $\kappa = 1.44 kT$. b) $\kappa = 0.72 kT$. c) $\kappa = 0$ (d'après [Kroll and Gompper, 1992]).

[Helfrich, 1985] (ce calcul présente l'avantage d'être assez intuitif mais comporte des erreurs corrigées par la suite [Helfrich, 1998]). Ces trois résultats prévoient une diminution de la rigidité si la taille L de la membrane augmente, c'est-à-dire si on observe la membrane à grande échelle. Les fluctuations semblent donc rendre la membrane plus flexible. Ce résultat est assez intuitif : il est en effet plus facile de courber une membrane qui est déjà froissée par ses propres fluctuations. Aux échelles suffisamment grandes, la perte de l'ordre orientationnel se fait donc par un froissage progressif de la membrane. Avec les valeurs précédentes de L , a et κ , on trouve $\kappa_{eff} = 0.76\kappa$ soit une diminution de 25 % de la rigidité de la membrane. La taille L pour laquelle $\kappa_{eff} = 0$ est du même ordre de grandeur que la longueur de persistance $\xi_p = a \exp(4\pi\kappa/kT)$. Si $L > \xi_p$, on s'attend à ce que la membrane devienne très froissée. Cet état froissé obtenu lorsque $\kappa \rightarrow 0$ est intéressant du point de vue théorique : une membrane auto-évitante dans l'état froissé est une structure ramifiée ayant asymptotiquement le même comportement en loi d'échelle qu'un polymère branché. Cet état froissé d'une membrane fluide n'a pas été observé expérimentalement pour une membrane lipidique. En revanche, des simulations numériques de Monte-Carlo [Leibler et al., 1987, Kroll and Gompper, 1992] ont mis en évidence un comportement analogue à celui d'un polymère branché si $\kappa \rightarrow 0$ (voir Fig. I.1.9). Il faut cependant rester prudent quant à l'interprétation de ces simulations à cause des effets de taille finie.

Cependant, il a été montré très récemment que l'on peut aussi prévoir une rigidification de la membrane à cause de ses fluctuations [Helfrich, 1998]. Pour une membrane plane en utilisant le 'modèle de pointes' (*hat model*) et pour une membrane de topologie sphérique à l'aide de développements en harmoniques sphériques, Helfrich trouve $r = -1$. Ce résultat surprenant suggère que la perte de l'ordre orientationnel se ferait par une rigidification (*crinkling*) de la

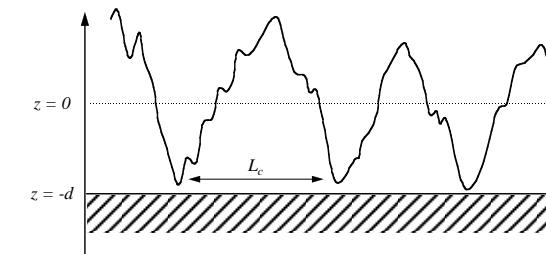


FIG. I.1.10: Schéma d'une membrane fluctuant près d'une paroi.

membrane.

Tout comme le module de courbure κ , la tension σ est modifiée en présence de fluctuations. Cette renormalisation de la tension par les fluctuations permet de clarifier la notion de membrane sans tension ou très faiblement tendue [David and Leibler, 1991]. Comme nous l'avons vu plus haut, la tension est définie par $\sigma = \partial F / \partial A$ où F est l'énergie libre de la membrane et A est la surface réelle de la membrane. La tension σ apparaît donc comme le paramètre intensif conjugué de la surface réelle A . Nous venons de voir qu'en présence de fluctuations, il faut distinguer la surface projetée A_p de la surface réelle A . On peut donc introduire un paramètre intensif conjugué de A_p défini par $\partial F / \partial A_p$, qui n'est autre que la tension renormalisée par les fluctuations σ_{eff} et qui correspond à la tension de surface physiquement observable. C'est cette tension renormalisée σ_{eff} qui tend vers zéro pour une membrane très faiblement tendue [Brochard et al., 1976, Peliti and Leibler, 1985, David and Leibler, 1991].

I.1.2.3 Fluctuations d'une membrane près d'une paroi

Force de Helfrich

Lorsqu'une membrane fluctue près d'une paroi (voir Fig. I.1.10) ou près d'une autre membrane, elle 'sent' plus ou moins la présence de l'obstacle en fonction de la distance moyenne qui les sépare d . Si la paroi est loin de la membrane, les fluctuations ne sont pas modifiées. En revanche, si la membrane est suffisamment proche de la paroi, elle peut entrer en 'contact' avec la paroi lorsque les fluctuations sont de grande amplitude. Les fluctuations de plus grande amplitude, celles de petits vecteurs d'onde, sont donc supprimées par la présence de la paroi. Le nombre de modes q de fluctuation, c'est-à-dire le nombre de conformations de la membrane, est diminué. En conséquence, l'entropie de la membrane diminue et son énergie libre augmente. Il apparaît donc une pression entropique qui repousse la membrane lorsqu'elle approche la paroi [Helfrich, 1978]. Cette pression entropique est désignée de plusieurs façons différentes, par exemple : force entropique répulsive, force de Helfrich, interaction stérique, force d'ondulation...

Pour une distance moyenne d entre la membrane et la paroi, la longueur d'onde L pour laquelle la membrane touche la paroi est appelée longueur de collision et notée L_c (voir Fig. I.1.10) et [Fisher and Fisher, 1982]). On la calcule facilement à partir du spectre de fluctuations (Eq. I.1.5) en imposant : $\langle u(L_c) \rangle \simeq d$. Pour une membrane sans tension, on utilise l'équation I.1.6 et on trouve :

$$L_c(d) \propto \sqrt{\frac{\kappa}{kT} d}. \quad (\text{I.1.13})$$

Supposons maintenant que la membrane perde une énergie kT à chaque ‘contact’ avec la paroi [Fisher and Fisher, 1982]. La distance entre points de contact coïncide avec la longueur de collision L_c . Pour un contact, la membrane perd donc une énergie par unité de surface égale à :

$$E(d) \propto \frac{kT}{L_c^2(d)}.$$

La pression entropique correspondant est définie par $P(d) = E(d)/d = kT/dL_c^2(d)$. Pour une membrane sans tension, l'équation I.1.13 donne une pression :

$$P(d) \propto \frac{(kT)^2}{\kappa d^3}. \quad (\text{I.1.14})$$

Pour une membrane tendue, à l'aide de l'équation I.1.7, on obtient :

$$L_c(d) \propto a \exp\left(c \frac{\sigma}{kT} \langle u(L_c) \rangle^2\right),$$

où c est une constante numérique. Dans le cas d'une membrane tendue, la tension introduit la longueur caractéristique $\sqrt{kT/\sigma}$. En présence d'une paroi, on peut montrer que la rugosité de la membrane $\langle u(L_c) \rangle$ n'est plus proportionnelle à d mais à \sqrt{d} [Lipowsky and Sackmann, 1995b, p. 549]. On a : $\langle u(L_c) \rangle^2 \propto d \times \sqrt{kT/\sigma}$. On en déduit :

$$L_c(d) \propto a \exp\left(c \sqrt{\frac{\sigma}{kT}} d\right). \quad (\text{I.1.15})$$

En répétant le calcul précédent, on trouve la pression entropique exercée par une paroi sur une membrane tendue :

$$P(d) \propto \exp\left(-2c \sqrt{\frac{\sigma}{kT}} d\right). \quad (\text{I.1.16})$$

Pour une membrane sans tension, la pression entropique est à longue portée en $1/d^3$ de la forme $P(d) = c'(kT)^2/(\kappa d^3)$. Le préfacteur c' a été estimé de plusieurs façons : $c' = 3\pi^2/64$ et $c' = 3/8$ [Helfrich, 1978, Israelachvili, 1992], $c' = 3\pi^2/128$ [Helfrich and Servuss, 1984], $c' = 0.074 - 0.116$ par simulations numériques de Monte-Carlo [Lipowsky and Zielinska, 1989, Janke and Kleinert, 1987, Gompper and Kroll, 1989], $c' = 0.043$ [Podgornik and Parsegian, 1992]. La loi de puissance Eq. I.1.14 a été vérifiée expérimentalement dans des systèmes multilamellaires sans tension [Safinya et al., 1986, Bassereau et al., 1987, Roux et al., 1994]. Dans le cas d'une membrane sous tension, l'amplitude des fluctuations étant beaucoup moins importante, la force entropique correspondante est à très courte portée et décroît de façon exponentielle.

Conséquences

Les forces attractives ou répulsives qui peuvent agir entre deux membranes ou entre une membrane et une paroi sont nombreuses [Israelachvili, 1992] : forces électrostatiques écrantées ou non, forces de van der Waals, forces d'hydratation, etc... La force de Helfrich décrite ci-dessus est répulsive et tend à séparer la membrane de la paroi. De portée supérieure aux forces de van der Waals, elle doit jouer un rôle prépondérant dans l'équilibre d'une membrane soumise à plusieurs interactions [Helfrich, 1978, Helfrich and Servuss, 1984, Evans and Parsegian, 1986]. Deux manifestations spectaculaires de la force répulsive de Helfrich ont été traitées théoriquement et vérifiées expérimentalement dans des systèmes membranaires multilamellaires ou vésiculaires : l'adhérence induite par la tension (*tension-induced adhesion*) et la transition de décollement (*unbinding transition*).

Si on supprime brutalement la répulsion entropique, par exemple, en mettant la membrane sous tension, on s'attend à observer une forte attraction (*tension-induced adhesion*). Pour mettre la membrane sous tension, plusieurs méthodes expérimentales ont été utilisées : aspiration de vésicules par une micropipette [Evans, 1980, Evans, 1991], ou augmentation de la pression osmotique de vésicules lipidiques [Servuss and Helfrich, 1989]. L'analyse du phénomène d'adhérence faible de vésicules sur un substrat [Rädler et al., 1995b] a permis de confirmer le rôle joué par la tension dans la répulsion entropique, comme prévu par les équations I.1.14 et I.1.16.

Lorsque plusieurs interactions sont en compétition, une diminution des interactions attractives peut induire une transition de décollement de la membrane (*unbinding transition*) par augmentation relative de la répulsion entropique. Cette transition a été prévue et analysée théoriquement [Lipowsky and Leibler, 1986, Evans, 1991]. Elle a été mise en évidence expérimentalement par changement de température dans des systèmes multilamellaires [Mutz and Helfrich, 1989].

I.1.3 Dynamique d'une membrane fluctuante

Les résultats de la section précédente sont tous des résultats statiques, indépendants du temps, alors que, de manière évidente, le phénomène de fluctuations thermiques est dynamique. Certaines expériences, par exemple de diffusion de lumière sur des bicouches suspendues (BLM pour *Black Lipid Membrane*) ou sur des phases lamellaires [Grabowski and Cowen, 1977, Crawford and Earnshaw, 1987, Nallet et al., 1989a], fournissent des renseignements sur la dynamique des fluctuations et un cadre théorique est nécessaire à leur interprétation [de Gennes and Papoulier, 1969, Brochard and de Gennes, 1975, Nallet et al., 1989b].

I.1.3.1 Equations hydrodynamiques d'une membrane libre

La membrane lipidique est un fluide bidimensionnel le plus souvent plongé dans un fluide tridimensionnel. Les fluctuations thermiques de la membrane couplent donc les déformations mé-

caniques de la membrane et l'hydrodynamique du fluide environnant. Plusieurs approches théoriques ont été utilisées : une approche d'hydrodynamique ‘classique’ dans le cadre de la théorie de la réponse linéaire [Brochard and Lennon, 1975, Ramaswamy, 1992, Prost and Bruinsma, 1996, Prost et al., 1998]) et une approche d'hydrodynamique covariante dans le cadre de la théorie de la renormalisation [Cai and Lubensky, 1994, Cai and Lubensky, 1995]. Bien que la seconde approche donne des résultats plus généraux – notamment en ce qui concerne la renormalisation des constantes élastiques–, les calculs que nous détaillerons par la suite relèvent de la première approche. Les notations pour la position de la membrane sont les mêmes qu'au paragraphe §I.1.2.2 (voir Fig. I.1.6). On notera $\mathbf{v} = (v_x, v_y, v_z)$ le vecteur vitesse du fluide et $P(\mathbf{r}, t)$ la pression hydrodynamique.

Equations du mouvement de la membrane

La viscosité du fluide est notée η . On peut estimer le nombre de Reynolds $Re = vL/\nu \simeq 10^{-5}$, avec une vitesse typique $v = 1\text{ }\mu\text{m/s}$ – on verra par la suite qu'une vitesse typique de déplacement d'une membrane fluctuante est donnée par $\kappa/\eta L^2$ –, une taille typique $L = 10\text{ }\mu\text{m}$ et en prenant pour la viscosité cinématique de l'eau $\nu = \eta/\rho_{\text{eau}} = 10^{-6}\text{ m}^2/\text{s}$. On est donc en présence d'un écoulement à faible nombre de Reynolds ce qui justifie l'utilisation de l'équation de Stokes :

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \nabla P(\mathbf{r}, t) + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t), \quad (\text{I.1.17})$$

où $\mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t)$ est la force par unité de volume exercée par les fluctuations thermiques sur le solvant.

On suppose le fluide incompressible :

$$\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = 0. \quad (\text{I.1.18})$$

La membrane est supposée perméable au solvant. La perméation du solvant à travers la membrane obéit à la loi de Darcy : le flux du solvant à travers la membrane est proportionnel à la force exercée sur la membrane. Le coefficient de proportionnalité est appelé coefficient de perméation et noté λ_p . Dans le référentiel lié à la membrane, la loi de Darcy s'écrit :

$$\frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = u(\mathbf{r}_-, t), t) = \lambda_p(\delta P(\mathbf{r}_-, t) - \delta \Pi(\mathbf{r}_-, t) + f_{th}(\mathbf{r}_-, t)),$$

où le membre de gauche est la vitesse relative de la membrane par rapport au fluide en $u(\mathbf{r}_-, t)$, c'est-à-dire le flux par unité de surface, et le membre de droite est la force par unité de surface : δP est la différence de pression entre les deux côtés de la membrane, $\delta \Pi$ est la différence de pression osmotique et f_{th} est la force par unité de surface due aux fluctuations thermiques. Si la membrane est perméable à toutes les impuretés éventuellement présentes en solution, on peut négliger la différence de pression osmotique $\delta \Pi$:

$$\frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = u(\mathbf{r}_-, t), t) = \lambda_p(\delta P(\mathbf{r}_-, t) + f_{th}(\mathbf{r}_-, t)), \quad (\text{I.1.19})$$

Les équations I.1.17, I.1.18, I.1.19 forment un système d'équations hydrodynamiques. Les conditions aux limites pour la vitesse normale v_z du fluide à la membrane sont incluses dans l'équation I.1.19. On impose pour la vitesse tangentielle du fluide la condition de non-glissement $\mathbf{v}_-(\mathbf{r}_-, z = u(\mathbf{r}_-, t), t) = 0$. La membrane est localement en équilibre mécanique donc la différence de pression entre les deux côtés de la membrane $\delta P(\mathbf{r}_-, t)$ doit être compensée par la force élastique $\delta \mathcal{H}/\delta u(\mathbf{r}_-, t)$ où \mathcal{H} est l'énergie de la membrane donnée par le hamiltonien de Canham-Helfrich (Eq. I.1.3) :

$$\mathcal{H} = \int \int_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 \right] dS.$$

On impose donc :

$$\delta P(\mathbf{r}_-, t) = -\frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_-, t)} = \sigma \nabla_-^2 u - \kappa \nabla_-^4 u. \quad (\text{I.1.20})$$

On peut inclure cette dernière condition aux limites dans l'équation I.1.17 :

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \nabla P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_-, t)} \delta(z - u) \mathbf{k} + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t). \quad (\text{I.1.21})$$

Pour de petits déplacements de la membrane, les équations du mouvement peuvent être développées à l'ordre 0 en u par $\delta(z - u) = \delta(z)$ dans l'équation I.1.21 et $v_z(\mathbf{r}_-, z = u(\mathbf{r}_-, t), t) = v_z(\mathbf{r}_-, z = 0, t)$ dans l'équation I.1.19 :

$$\begin{aligned} \eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_-, t)} \delta(z) \mathbf{k} + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= 0 \\ \frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = 0, t) &= \lambda_p(\delta P(\mathbf{r}_-, t) + f_{th}(\mathbf{r}_-, t)). \end{aligned} \quad (\text{I.1.22})$$

Pour finir, on doit spécifier les fonctions de corrélation du bruit thermique surfacique f_{th} et volumique \mathbf{f}_h . La membrane étant à l'équilibre thermodynamique, on a d'après le théorème fluctuation-dissipation [Landau and Lifchitz, 1990a] :

$$\begin{aligned} \langle f_{th}(\mathbf{r}_-, t) \rangle &= 0 \\ \langle f_{th}(\mathbf{r}_-, t) f_{th}(\mathbf{r}'_-, t') \rangle &= 2 \frac{kT}{\lambda_p} \delta(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}'_-) \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{I.1.23})$$

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \rangle &= 0 \\ \langle \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t)_i \mathbf{f}_h(\mathbf{r}', t')_j \rangle &= -2kT\eta(-\delta_{ij} \nabla^2 + \partial_i \partial_j) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{I.1.24})$$

Equation de Langevin

On utilise la transformation de Fourier tridimensionnelle définie par :

$$f(\mathbf{r}, t) = \int \int \int f(\mathbf{q}, t) \exp(i\mathbf{qr}) \frac{d^3 \mathbf{q}}{(2\pi)^3},$$

où la fonction f peut être la vitesse \mathbf{v} du fluide ou la pression hydrodynamique P . On notera toujours de la même façon f et sa transformée de Fourier. Pour le déplacement $u(\mathbf{r}_-, t)$ de la membrane, la transformée de Fourier $u(\mathbf{q}_-, t)$ est définie par :

$$u(\mathbf{r}_-, t) = \iint u(\mathbf{q}_-, t) \exp(i\mathbf{q}_-\cdot\mathbf{r}_-) \frac{d^2\mathbf{q}_-}{(2\pi)^2}.$$

L'équation I.1.21 linéarisée par $u \simeq 0$ devient (voir Eqs. I.1.22) :

$$-\eta q^2 \mathbf{v}(\mathbf{q}, t) - i\mathbf{q}P(\mathbf{q}, t) - (\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2)u\mathbf{k} - \mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) = 0. \quad (\text{I.1.25})$$

En projetant I.1.25 sur le plan (x, y) et en utilisant l'équation d'incompressibilité I.1.18 $q_z v_z + \mathbf{q}_-\cdot\mathbf{v}_- = 0$, on trouve :

$$\eta q^2 v_z = i \frac{q_-^2}{q_z} P(\mathbf{q}, t) + \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{q}_-}{q_z} \quad (\text{I.1.26})$$

Puis, en projetant I.1.25 dans la direction z , on obtient l'expression de P en fonction de u :

$$P(\mathbf{q}, t) = -\frac{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2}{i} \frac{q_z}{q^2} u(\mathbf{q}_-, t) - \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{q}}{iq^2}. \quad (\text{I.1.27})$$

On calcule ensuite la discontinuité de pression à travers la membrane $\delta P(\mathbf{q}_-, t) = P(\mathbf{q}_-, z = u, t) - P(\mathbf{q}_-, z = u, t)$ où $P(\mathbf{q}_-, z, t) = 1/2\pi \int P(\mathbf{q}, t) \exp(iq_z z) dq_z$. En intégrant sur q_z et en sommant sur le plan complexe à l'aide de la méthode des résidus, on trouve :

$$\delta P(\mathbf{q}_-, t) = -(\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2)u(\mathbf{q}_-, t), \quad (\text{I.1.28})$$

ce qui est bien en accord avec l'équation d'équilibre mécanique local Eq. I.1.20.

A l'aide de l'équation I.1.26 et de l'expression de P en fonction de u (Eq. I.1.27), on déduit :

$$v_z(\mathbf{q}, t) = -\frac{q_-^2}{\eta q^4} (\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2)u(\mathbf{q}_-, t) + \frac{q_z}{\eta q^4} \mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{q} + \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{k}}{\eta q^2}.$$

On peut ensuite calculer $v_z(\mathbf{q}_-, z = 0, t) = \int \mathbf{v}(\mathbf{q}, t) \exp(iq_z z) dq_z / 2\pi$. En intégrant sur q_z , on trouve :

$$v_z(\mathbf{q}_-, z = u, t) = -\frac{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2}{4\eta q_-} u(\mathbf{q}_-, t) - \frac{1}{2\pi\eta} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{k}}{q^2} dq_z. \quad (\text{I.1.29})$$

En remplaçant $\delta P(\mathbf{q}_-, t)$ (Eq. I.1.28) et $v_z(\mathbf{q}_-, z = 0, t)$ (Eq. I.1.29) dans l'équation I.1.22 exprimant la loi de Darcy linéarisée, on trouve que u vérifie l'équation de Langevin suivante :

$$\boxed{\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}u(\mathbf{q}_-, t) = \lambda_p \left[f_{th}(\mathbf{q}_-, t) + \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t)\cdot\mathbf{k}}{q^2} dq_z \right]}, \quad (\text{I.1.30})$$

où

$$\boxed{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_-} \right) (\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4)}. \quad (\text{I.1.31})$$

$\tau_m(\mathbf{q}_-)$ est le temps de relaxation de la membrane et son inverse, $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}$, est appelé taux de relaxation de la membrane. On peut distinguer plusieurs régimes : la relaxation par l'hydrodynamique domine aux petits vecteurs d'onde $q_- < 1/\lambda_p\eta$ alors que la relaxation par la perméation domine si $q_- > 1/\lambda_p\eta$. Pour une membrane sans tension, la puissance élastique fournie par unité de surface dS est : $\mathcal{P}_f = \kappa q_-^4 u \partial u / \partial t$. Cette puissance est dissipée soit par l'hydrodynamique dans le volume de fluide dS/q_- (les flux hydrodynamiques au voisinage de la membrane décroissent exponentiellement en $\exp(-q_- z)$ sur une distance caractéristique $1/q_-$) : $\mathcal{P}_h = \eta \nabla^2 \mathbf{v} \partial u / \partial t q_- \simeq \eta q_- (\partial u / \partial t)^2$; soit par la perméation dans la membrane : $\mathcal{P}_p = (\partial u / \partial t)^2 / \lambda_p$. En égalant puissance fournie et puissance dissipée, on retrouve bien les deux taux de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} \propto \kappa q_-^3 / \eta$ pour la dissipation visqueuse et $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} \propto \lambda_p \kappa q_-^4$ pour la dissipation par la perméation.

On peut résoudre l'équation de Langevin I.1.30 en utilisant les fonctions de corrélation des bruits thermiques f_{th} et \mathbf{f}_h données par le théorème fluctuation-dissipation (voir Eqs. I.1.23 et I.1.24) [Prost and Bruinsma, 1996]. On retrouve alors le spectre de fluctuations (Eq. I.1.5) :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2},$$

où, comme nous l'avons déjà remarqué, n'intervient aucun paramètre dynamique. On voit ici que l'application du théorème fluctuation-dissipation est cruciale pour que la dépendance avec la viscosité η disparaisse. La condition d'équilibre thermodynamique étant nécessaire pour appliquer le théorème fluctuation-dissipation, le spectre de fluctuations trouvé ci-dessus n'est valable que pour des fluctuations d'origine thermique.

Réponse linéaire

Une approche équivalente consiste à utiliser la théorie de la réponse linéaire [Brochard and Lennon, 1975]. On introduit la fonction de réponse χ définie par le produit de convolution $u(\mathbf{r}_-, t) = \int d^2\mathbf{r}'_- \int^t \chi(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}', t - t') P_{ext}(\mathbf{r}', t') dt'$ où $P_{ext}(\mathbf{r}_-, t) = P_{ext} \exp i(\mathbf{q}_-\cdot\mathbf{r}_- + \omega t)$ est une contrainte extérieure sinusoïdale. En utilisant la transformation de Fourier, on a : $u(\mathbf{q}_-, \omega) = \chi(\mathbf{q}_-, \omega) P_{ext}$. On peut ensuite en déduire la fonction de réponse $\chi(\mathbf{q}_-, \omega)$ en résolvant les équations hydrodynamiques avec les conditions aux limites indiquées plus haut (voir Eq. I.1.22) [Brochard and Lennon, 1975]. Pour une membrane sans tension, on trouve deux fréquences propres : un mode rapide inertiel que nous ne discuterons pas et un mode lent pour lequel la force de friction hydrodynamique est compensée par la force élastique :

$$\omega = i \frac{\kappa q_-^3}{2\eta}.$$

La fréquence de ce mode lent est imaginaire pure : la membrane relaxe vers sa position d'équilibre sans osciller. Ce résultat est donc bien équivalent au temps de relaxation trouvé plus haut (voir Eq. I.1.31) pour une membrane sans tension ($\sigma = 0$) et dans le régime de relaxation dominé par l'hydrodynamique ($q_- < 1/\lambda_p\eta$).

Pour finir, on peut retrouver le spectre de fluctuations d'une membrane sans tension I.1.5 puisque le théorème fluctuation-dissipation impose :

$$\begin{aligned}\langle u(\mathbf{q}_-, \omega)^2 \rangle &= -\frac{kT}{\pi\omega} \text{Im}\chi(\mathbf{q}_-, \omega) \\ &= \frac{kT}{\pi} \frac{1}{\eta q_- (\omega^2 + (\kappa q_-^3 / 2\eta)^2)}.\end{aligned}$$

En intégrant sur les fréquences, on retrouve bien :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} \langle u(\mathbf{q}_-, \omega)^2 \rangle d\omega = \frac{kT}{\kappa q_-^4}.$$

Le même genre d'approche a été utilisée pour calculer la relation de dispersion $\omega(q)$ d'ondes capillaires dans des bicouches suspendues sous tension (BLM) [Kramer, 1971, Fan, 1973, Crilly and Earnshaw, 1983]. La relation de dispersion est donnée par :

$$i\omega - \sigma q_-^3 (q_- - m) / 2i\rho m \omega = 0, \quad (\text{I.1.32})$$

avec $m = (q_-^2 + i\rho\omega/\eta)^{1/2}$ et ρ la densité du fluide environnant. Plusieurs modes sont prévus à partir de cette relation de dispersion : dans un régime de fort amortissement, on retrouve le mode rapide inertiel cité plus haut ainsi qu'une nouvelle fréquence propre :

$$\omega = i \frac{\sigma q_-}{4\eta},$$

qui correspond au taux de relaxation (Eq. I.1.31) d'une membrane tendue où la relaxation hydrodynamique domine. Les expériences de diffusion de lumière sont particulièrement bien adaptées pour tester ces prévisions théoriques et ont permis de confirmer la relation de dispersion Eq. I.1.32 [Grabowski and Cowen, 1977, Crawford and Earnshaw, 1987, Hirn et al., 1999].

I.1.3.2 Équations hydrodynamiques d'une membrane près d'une paroi

Lorsque la membrane fluctue près d'une paroi, nous avons vu au paragraphe §I.1.2.3 que la présence de la paroi modifie les fluctuations et donne naissance à une force entropique répulsive à longue portée (voir Fig. I.1.10).

Lorsque la relaxation est dominée par la perméation, on s'attend à ce que la paroi ne joue aucun rôle puisque la perméation ne nécessite aucun flux hydrodynamique. En revanche, si la relaxation est dominée par l'hydrodynamique, la paroi va jouer un rôle. L'amplitude des flux hydrodynamiques décroît exponentiellement sur une distance de l'ordre de $1/q_-$. Si la membrane est suffisamment loin de la paroi, c'est-à-dire si $q_- \gg 1/d$, alors la dynamique des fluctuations n'est pas modifiée par la présence de la paroi. En revanche, la présence de la paroi joue un rôle pour les modes tels que $q_- \ll 1/d$ (voir Fig. I.1.11).

Les équations hydrodynamiques et les conditions aux limites sur la membrane sont identiques à celles du §I.1.3.1. Il s'agit des équations non-linéaires I.1.17, I.1.18 et I.1.19 auxquelles on ajoute

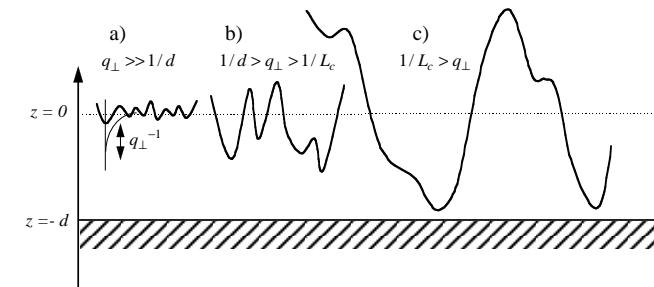


FIG. I.1.11: Fluctuations d'une membrane près d'une paroi. a) La membrane n'est pas influencée par la présence de la paroi si $q_- \gg 1/d$. b) Approximation de lubrification si $1/d \ll 1/L_c$. c) Suppression des fluctuations si $1/L_c \gg q_-$.

la condition limite $\mathbf{v}(\mathbf{r}_-, z = -d, t) = \mathbf{0}$ sur la paroi située en $z = -d$. Le problème majeur que l'on rencontre lors de la résolution de ces équations est lié à l'hydrodynamique du fluide intercalé entre la paroi et la membrane. On peut simplifier le problème de plusieurs façons. La première consiste à utiliser l'approximation de lubrification puis à linéariser pour $u \ll d$. On peut aussi utiliser la théorie de la réponse linéaire. Enfin, un calcul linéaire au premier ordre peut être envisagé, sans utiliser l'approximation de lubrification.

Approximation de lubrification

L'approximation de lubrification est utilisée pour simplifier l'hydrodynamique de l'écoulement du fluide situé entre la paroi et la membrane dans le cas où le film intercalé est mince ($d \rightarrow 0$). On suppose (i) que l'écoulement est essentiellement bidimensionnel et situé dans le plan (x, y) et (ii) que la variation de l'écoulement est beaucoup plus rapide dans la direction z que dans le plan (x, y) .

On fait de plus l'hypothèse de linéarisation $u \ll d$. En effet, si on néglige la perméation, la conservation du flux entre la membrane et la paroi fait intervenir la densité de flux de solvant [Prost et al., 1998] :

$$\mathbf{Q}(\mathbf{r}_-, t) = -\frac{1}{12} \frac{(d + u(\mathbf{r}_-, t))^3}{\eta} \nabla_{\perp} P(\mathbf{r}_-, t),$$

qui n'est pas linéaire en u . On simplifie donc le calcul en imposant $u \ll d$.

Avec ces hypothèses, on montre [Prost et al., 1998] que l'on obtient une équation de Langevin analogue à celle obtenue pour une membrane libre (voir Eq. I.1.30) :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) = \lambda_p \left[f_{th}(\mathbf{r}_-, t) + \frac{d^3 q_-^2}{\eta \lambda_p} \tilde{P}(\mathbf{q}_-, t) \right], \quad (\text{I.1.33})$$

où $\tilde{P}(\mathbf{q}_-, t)$ est la contribution à la pression hydrodynamique dans la région située entre la

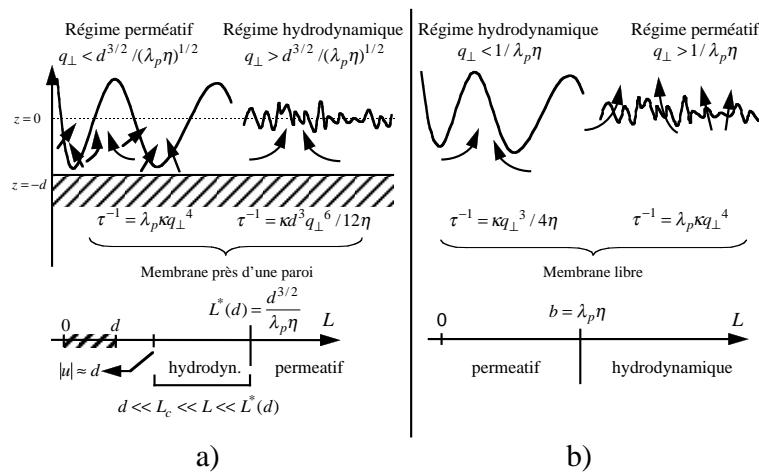


FIG. I.1.12: Différents régimes pour une membrane sans tension. a) La membrane fluctue près d'une paroi. b) La membrane est libre.

paroi et la membrane due aux fluctuations thermiques \mathbf{f}_h et où le taux de relaxation est donné par :

$$\tau_m(\mathbf{q}_{\perp})^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{d^3 q_{\perp}^2}{12\eta} \right) (\sigma q_{\perp}^2 + \kappa q_{\perp}^4). \quad (\text{I.1.34})$$

Le théorème fluctuation-dissipation implique les fonctions de corrélation suivantes pour le bruit d'origine hydrodynamique \tilde{P} [Prost et al., 1998] :

$$\begin{aligned} \langle \tilde{P}(\mathbf{q}_{\perp}, t) \rangle &= 0 \\ \langle \tilde{P}(\mathbf{q}_{\perp}, t) \tilde{P}(\mathbf{q}'_{\perp}, t') \rangle &= \frac{\eta}{d^3 q_{\perp}^2} kT \delta(\mathbf{q}_{\perp} + \mathbf{q}'_{\perp}) \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{I.1.35})$$

On voit d'après l'expression de $\tau_m(\mathbf{q}_{\perp})^{-1}$ (Eq. I.1.34) que, contrairement au cas d'une membrane libre, la relaxation par l'hydrodynamique domine aux grands vecteurs d'onde $q_{\perp} > \sqrt{\lambda_p \eta} / d^{3/2}$ alors que la relaxation par la perméation domine si $q_{\perp} < \sqrt{\lambda_p \eta} / d^{3/2}$. Cela est dû au fait que le volume est conservé dans le cas de la relaxation hydrodynamique alors qu'il ne l'est pas pour la perméation. Pour des fluctuations de grande longueur d'onde, il est plus rapide pour le solvant situé entre la paroi et la membrane de passer à travers la membrane par perméation plutôt que de s'écouler sous la membrane par un flux hydrodynamique (voir Fig. I.1.12).

On sait (voir §I.1.2.3) que pour les petits vecteurs d'onde, l'amplitude des fluctuations augmente (voir Eq. I.1.5) et que la membrane 'touche' la paroi si $q_{\perp} < 1/L_c$ où L_c est la longueur

de collision. L'amplitude des fluctuations u est alors du même ordre de grandeur que la distance d entre la membrane et la paroi. L'équation I.1.33 a été établie avec l'hypothèse $u \ll d$ et ne sera donc valable que pour des vecteurs d'onde tels que $1/L_c \ll q_{\perp}$ (voir Fig. I.1.11).

Réponse linéaire

En utilisant la théorie de la réponse linéaire décrite au paragraphe §I.1.3.1, on peut calculer la fonction de réponse $\chi(\mathbf{q}_{\perp}, \omega)$ à une perturbation extérieure en présence d'une paroi [Brochard and Lennon, 1975]. Comme dans l'approximation de lubrification, ce calcul suppose $1/L_c \ll \mathbf{q}_{\perp} \ll 1/d$. On trouve encore deux fréquences propres : un mode rapide que nous ignorerons et un mode lent :

$$\omega = i \frac{\kappa q_{\perp}^6 d^3}{24\eta}.$$

La encore, cette fréquence est imaginaire pure et correspond bien au temps de relaxation qui intervient dans l'équation de Langevin Eq. I.1.34 pour une membrane sans tension en négligeant la perméation.

On peut aussi retrouver le spectre de fluctuations d'une membrane sans tension I.1.5 puisque comme précédemment :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_{\perp}, \omega)^2 \rangle &= -\frac{kT}{\pi\omega} \text{Im}\chi(\mathbf{q}_{\perp}, \omega) \\ &= \frac{kT}{\pi} \frac{q_{\perp}^2 d^3}{12\eta(\omega^2 + (\kappa q_{\perp}^6 d^3 / 24\eta)^2)}. \end{aligned}$$

En intégrant sur les fréquences, on retrouve bien :

$$\langle u(\mathbf{q}_{\perp})^2 \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} \langle u(\mathbf{q}_{\perp}, \omega)^2 \rangle d\omega = \frac{kT}{\kappa q_{\perp}^4}.$$

Calcul linéaire

Les deux approches précédentes ne donnent des résultats valides que si $1/L_c \ll \mathbf{q}_{\perp} \ll 1/d$. Pour calculer le temps de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_{\perp})$, l'approximation de lubrification et l'hypothèse de linéarisation $u \ll d$ ont été utilisées. On a voulu, à partir des équations I.1.17, I.1.18 et I.1.19, et sans utiliser l'approximation de lubrification, établir l'expression de $\tau_m(\mathbf{q}_{\perp})$ valable pour tous les vecteurs d'onde \mathbf{q}_{\perp} .

La figure I.1.13 présente les notations utilisées. La paroi est placée en $z = -d$. On distingue deux régions : $\infty > z > u$ (notée 1) et la région située entre la paroi et la membrane $u > z > -d$ (notée 2). A priori, les viscosités dans les deux régions peuvent être différentes, mais on supposera ici $\eta_1 = \eta_2$. Les équations hydrodynamiques dans les deux régions sont donc identiques :

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \nabla P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}, t)} \delta(z - u) \mathbf{k}$$

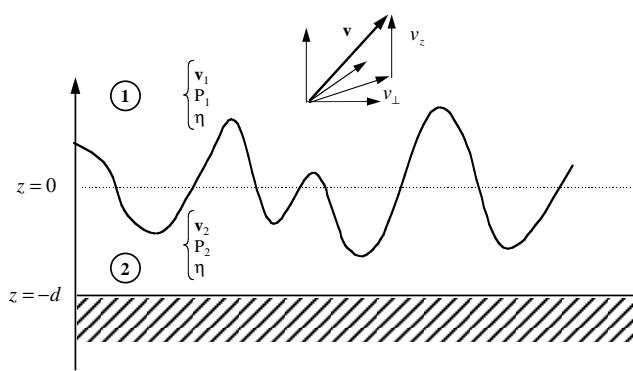


FIG. I.1.13: Notations pour le calcul linéaire.

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

$$\frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = u, t) = \lambda_p \delta P(\mathbf{r}_-, t),$$

où on a négligé le bruit thermique f_{th} et \mathbf{f}_h . En effet, on cherche ici seulement à calculer le temps de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_-)$. On a vu précédemment (voir §I.1.3.1) que le bruit thermique n'intervient qu'au moment de la résolution de l'équation de Langevin et pas dans le calcul du temps de relaxation.

Ces équations peuvent être linéarisées pour $u \simeq 0$:

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \nabla P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}, t)} \delta(z) \mathbf{k}$$

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

$$\frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = \lambda_p \delta P(\mathbf{r}_-, t).$$

Precisons les conditions aux limites. Sur la paroi, on impose $\mathbf{v}(z = -d, t) = \mathbf{0}$ puisque la paroi est imperméable et que l'on suppose que le fluide ne glisse pas sur la paroi. Comme précédemment (voir §I.1.3.1, Eq. I.1.20), l'équilibre mécanique local de la membrane impose que la différence de pression entre les deux côtés de la membrane $\delta P(\mathbf{r}_-, t)$ soit compensée par la force élastique $\delta \mathcal{H} / \delta u(\mathbf{r}_-, t)$, où \mathcal{H} est le hamiltonien de Canham-Helfrich I.1.3. Pour les conditions aux limites sur la membrane, c'est-à-dire en $z = 0$, on peut faire deux types d'hypothèses différentes : soit on suppose que la vitesse du fluide et les contraintes hydrodynamiques sont continues à travers la membrane ; soit on suppose que la membrane est incompressible, donc seule la composante normale de \mathbf{v} est continue alors que la composante tangentielle s'annule.

Avec la première série d'hypothèses, on trouve les conditions aux limites suivantes :

$$\begin{cases} \mathbf{v}_{-2}(\mathbf{r}_-, z = -d, t) = \mathbf{0} \\ v_{z2}(\mathbf{r}_-, z = -d, t) = 0 \end{cases}$$

$$\begin{cases} v_{z1}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = v_{z2}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) \\ \mathbf{v}_{-1}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = \mathbf{v}_{-2}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) \\ \partial \mathbf{v}_{-1} / \partial z(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = \partial \mathbf{v}_{-2} / \partial z(\mathbf{r}_-, z = 0, t) \end{cases} \quad (I.1.36)$$

$$P_1(\mathbf{r}_-, z = 0, t) - P_2(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = -\frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_-, t)} = \sigma \nabla_-^2 u - \kappa \nabla_-^4 u.$$

Les conditions aux limites obtenues avec la deuxième série d'hypothèses sont :

$$\begin{cases} \mathbf{v}_{-2}(\mathbf{r}_-, z = -d, t) = \mathbf{0} \\ v_{z2}(\mathbf{r}_-, z = -d, t) = 0 \end{cases} \quad (I.1.37)$$

$$\begin{cases} v_{z1}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = v_{z2}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) \\ \mathbf{v}_{-1}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = \mathbf{0} \\ \mathbf{v}_{-2}(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = \mathbf{0} \end{cases}$$

$$P_1(\mathbf{r}_-, z = 0, t) - P_2(\mathbf{r}_-, z = 0, t) = -\frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}_-, t)} = \sigma \nabla_-^2 u - \kappa \nabla_-^4 u.$$

On utilise la transformation de Fourier bidimensionnelle (voir Eq. I.1.4) définie par :

$$f(\mathbf{r}_-, z, t) = \iint f(\mathbf{q}_-, z, t) \exp(i \mathbf{q}_- \cdot \mathbf{r}_-) \frac{d^2 \mathbf{q}_-}{(2\pi)^2},$$

où f représente soit le déplacement u de la membrane, soit la vitesse \mathbf{v} du fluide, soit la pression hydrodynamique P . On utilisera la même notation pour f et sa transformée de Fourier.

Les équations hydrodynamiques linéarisées par $u \simeq 0$ s'écrivent alors :

$$\begin{cases} \eta \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} - \eta \mathbf{q}_-^2 v_z = \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u} \delta(z) + \frac{\partial P}{\partial z} \\ \eta \frac{\partial^2 \mathbf{v}_\perp}{\partial z^2} - \eta \mathbf{q}_-^2 \mathbf{v}_\perp = i \mathbf{q}_- P \end{cases} \quad (I.1.38)$$

$$\frac{\partial v_z}{\partial z} + i \mathbf{q}_- \cdot \mathbf{v}_\perp = 0 \quad (I.1.39)$$

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{q}_-, z = 0, t) = \lambda_p \delta P(\mathbf{q}_-, t). \quad (I.1.40)$$

Et l'équation d'équilibre local de la membrane devient :

$$P_1(\mathbf{q}_-, z = 0, t) - P_2(\mathbf{q}_-, z = 0, t) = -(\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4) u(\mathbf{q}_-, t). \quad (I.1.41)$$

On a donc six inconnues (\mathbf{v}_{-i} , v_{zi} , P_i avec $i = 1, 2$), six équations (Eqs. I.1.38 et I.1.39 dans les zones 1 et 2) et six conditions aux limites (Eqs. I.1.36 et I.1.37). La démarche pour la résolution est la suivante : on multiplie l'équation I.1.38 par $i \mathbf{q}_-$, on remplace $i \mathbf{q}_- \cdot \mathbf{v}_\perp$ par $-\partial v_z / \partial z$ grâce à l'équation I.1.39 et on déduit :

$$P = \frac{\eta}{\mathbf{q}_-^2} \left(\frac{\partial^3 v_z}{\partial z^3} - \mathbf{q}_-^2 \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) \quad (I.1.42)$$

En remplaçant P dans l'équation I.1.38, on trouve que, dans les deux zones 1 et 2, v_z vérifie l'équation différentielle suivante :

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - \mathbf{q}_-^2 \right) \left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - \mathbf{q}_-^2 \right) v_z(z, \mathbf{q}_-, t) = 0 \quad (I.1.43)$$

On en déduit v_z dans les zones 1 et 2 en imposant que v_{z_1} ne diverge pas si $z \rightarrow \infty$:

$$v_{z_1}(z, \mathbf{q}_-, t) = B'e^{-q_\perp z}(1 + D'z) \quad (\text{I.1.44})$$

$$v_{z_2}(z, \mathbf{q}_-, t) = Ae^{q_\perp z}(1 + Cz) + Be^{-q_\perp z}(1 + Dz) \quad (\text{I.1.45})$$

En utilisant $v_- = -(1/iq_-)\partial v_z/\partial z$ d'après l'équation I.1.39, on trouve v_{-i} ($i = 1, 2$) en fonction des constantes d'intégration A, B, C, D, B', D' . Puis, grâce à l'équation I.1.42, on déduit P_i ($i = 1, 2$) en fonction des mêmes constantes d'intégration.

On utilise ensuite les conditions aux limites (Eqs. I.1.36 ou I.1.37) pour trouver les constantes d'intégration. Seules les deux constantes A et B nous intéressent ici puisque c'est $v_z(\mathbf{q}_-, z = 0, t) = A + B$ qui intervient dans l'équation I.1.40 permettant de déduire l'équation de Langevin et le temps de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_-)$.

Après calcul, on trouve avec les conditions aux limites I.1.36 :

$$A = -\frac{\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4}{4\eta q} u$$

$$B = \frac{\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4}{4\eta q} \left(1 + 2q_- d + 2q_-^2 d^2\right) e^{-2q_\perp d} u.$$

En utilisant les conditions aux limites I.1.37, on obtient :

$$A = -\frac{\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4}{4\eta q} u$$

$$B = -\frac{\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4}{4\eta q} \left(\frac{1 + 2q_- d + 2q_-^2 d^2 - e^{-2q_\perp d}}{1 - 2q_- d + 2q_-^2 d^2 - e^{2q_\perp d}}\right) u.$$

On en déduit donc $v_z(\mathbf{q}_-, z = 0, t)$ que l'on reporte dans l'équation I.1.40 pour aboutir à l'équation de Langevin suivante (dans laquelle le bruit thermique est négligé) :

$$\boxed{\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) = 0, \quad (\text{I.1.46})}$$

où le taux de relaxation est donné par :

$$\boxed{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left[\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_-} \left(1 - (1 + 2q_- d + 2q_-^2 d^2)e^{-2q_\perp d}\right)\right] [\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4], \quad (\text{I.1.47})}$$

en utilisant les conditions aux limites de continuité de la vitesse et des contraintes sur la membrane (Eqs. I.1.36), ou bien par :

$$\boxed{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left[\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_-} \left(1 + \frac{1 + 2q_- d + 2q_-^2 d^2 - e^{-2q_\perp d}}{1 - 2q_- d + 2q_-^2 d^2 - e^{2q_\perp d}}\right)\right] [\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4], \quad (\text{I.1.48})}$$

si on utilise les conditions aux limites de non-glissement du fluide sur la membrane (Eqs. I.1.37).

Si $d \rightarrow \infty$ ou si $q_- \gg 1/d$, on retrouve bien dans les deux cas l'équation I.1.31 exprimant le taux de relaxation d'une membrane libre :

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

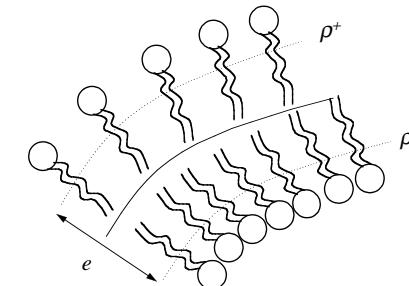


FIG. I.1.14: Schéma d'une bicouche à l'échelle microscopique : la courbure de la bicouche comprime le feuillet inférieur par rapport au feuillet supérieur (d'après [Seifert and Langer, 1993]).

Si $q_- d \rightarrow 0$, on se trouve dans les conditions de l'approximation de lubrification (voir §I.1.3.2). En effectuant un développement limité de l'exponentielle intervenant dans le taux de relaxation I.1.47, on retrouve le résultat de l'approximation de lubrification (Eq. I.1.34, p. 27), au facteur numérique près :

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{q_-^2 d^3}{3\eta}\right) (\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4).$$

Avec l'expression du taux de relaxation donnée par I.1.48, on retrouve exactement le résultat de l'approximation de lubrification :

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{q_-^2 d^3}{12\eta}\right) (\sigma \mathbf{q}_-^2 + \kappa \mathbf{q}_-^4).$$

I.1.3.3 Aspects microscopiques : rôle de la viscosité de la membrane

Les équations du paragraphe précédent ne tiennent pas compte de la structure en bicouche de la membrane lipidique : on a négligé l'épaisseur de la membrane devant les autres dimensions caractéristiques et on a décrit la membrane comme une simple interface séparant deux milieux aqueux. Pourtant, lors d'une déformation de la membrane, les deux feuillets constituant la membrane ne sont pas équivalents : l'une des monocouches est comprimée tandis que l'autre est étirée (voir Fig. I.1.14). Les densités locales des deux feuillets sont différentes. Il y a donc une friction entre les deux monocouches, qui constitue une source additionnelle de dissipation [Evans, 1974]. On introduit un coefficient de friction f_{mb} ou, de manière équivalente, une viscosité de membrane η_{mb} dont le rôle n'est pas forcément négligeable devant celui de la viscosité du solvant, surtout pour les fluctuations de faible longueur d'onde ($q_-^{-1} \simeq e$ où e est l'épaisseur de la membrane).

On rend compte de cet effet de friction et du couplage entre les deux monocouches par un nouveau terme dans le hamiltonien (Eq. I.1.3) [Svetina and Zeks, 1983, Svetina and Zeks, 1989,

Miao et al., 1991, Seifert and Langer, 1993, Hansen et al., 1998] :

$$\mathcal{H} = \int \int_A \left[\frac{1}{2} \kappa c^2 + \frac{1}{2} \chi' ((\rho^+ + ec)^2 + (\rho^- - ec)^2) \right] dS, \quad (I.1.49)$$

où c est la courbure de la membrane, χ' est le module élastique associé à la déformation relative des deux monocouches, analogue au module de compressibilité χ introduit au paragraphe §I.1.2.1, et ρ^\pm est la densité adimensionnée de chaque monocouche. Ce nouveau terme représente l'énergie élastique due à la différence de courbure entre les deux monocouches, pour une membrane sans tension, sans courbure spontanée ni gaussienne. Un calcul hydrodynamique analogue à celui du §I.1.3.1 fournit les différents temps de relaxation de la membrane. Dans la limite $q_- \rightarrow 0$, on retrouve le taux de relaxation du mode de courbure : $\tau_1(q_-)^{-1} = \kappa q_-^3 / 4\eta$ caractéristique d'une membrane libre sans tension (voir Eq. I.1.31) et un nouveau mode apparaît, lié à la friction entre les deux monocouches : $\tau_2(q_-)^{-1} = \chi' q_-^2 / 2f_{mb}$. A plus grand vecteur d'onde, les deux modes se mélangent [Seifert and Langer, 1993].

Après intégration sur la surface de la membrane [Lipowsky and Sackmann, 1995a], on obtient l'énergie suivante, connue sous le nom de modèle ADE (*Area-Difference-Elasticity*) :

$$\mathcal{H} = \int \int_A \left[\frac{1}{2} \kappa c^2 + \frac{\chi'}{4A_0} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \right] dS, \quad (I.1.50)$$

où $\Delta A - \Delta A_0$ est la variation de la différence d'aire entre les deux monocouches ΔA par rapport à l'équilibre (noté par l'indice 0). On peut définir un nouveau module élastique, appelé module de courbure non locale, défini par : $\bar{\kappa} = \chi' e^2 / 2\pi$ et qui a les mêmes dimensions que le module de courbure classique κ . On reviendra sur les résultats prévus par le modèle ADE au paragraphe §I.3.1.3.

Chapitre I.2

Membranes biologiques

La membrane cellulaire a joué un rôle essentiel lors de l'apparition et du développement de la vie, puisqu'elle a permis de séparer l'intérieur de la cellule de l'environnement extérieur. Les échanges entre la cellule et l'extérieur sont contrôlés au niveau de la membrane de manière passive, grâce à sa perméabilité limitée, mais aussi de façon active. Cette activité est caractéristique du fonctionnement normal d'une cellule vivante : une cellule vivante n'est pas à l'équilibre thermodynamique. Nous qualifierons d'"actif" tout phénomène hors équilibre nécessitant une dissipation d'énergie. De façon évidente, les membranes biologiques peuvent être qualifiées de membranes actives. Dans ce chapitre, nous commencerons par décrire la composition des membranes biologiques, puis nous donnerons quelques exemples où la membrane joue un rôle actif dans les phénomènes cellulaires.

I.2.1 Composition des membranes biologiques

La membrane plasmique constitue l'enveloppe de la cellule, séparant le cytoplasme de l'extérieur. La taille typique d'une cellule animale varie de 10 à 30 µm. A l'intérieur de la cellule, les différentes organites forment des entités distinctes séparées du cytoplasme par une membrane (voir Fig. I.2.1). On trouve ainsi plusieurs types de membranes cellulaires : membrane constituant le réticulum endoplasmique, les lysosomes, l'appareil de Golgi ou les vésicules d'endocytose et d'exocytose, enveloppe nucléaire, membranes mitochondriales etc... La membrane plasmique ne représente qu'une fraction de la membrane cellulaire totale, comme on peut le constater sur le tableau ci-dessous (Tab. I.2.1). Néanmoins, nous nous intéresserons dans la suite essentiellement aux propriétés de la membrane plasmique, même si certaines remarques s'appliqueront aussi aux autres types de membranes.

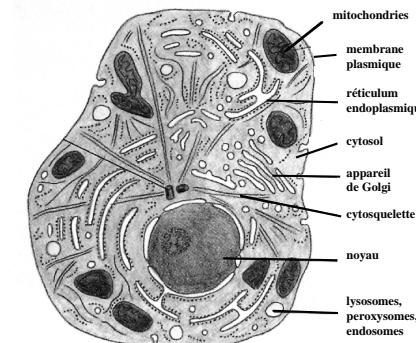


FIG. I.2.1: Schéma d'une cellule animale montrant la membrane plasmique, le cytosquelette et les différents organites présents dans la cellule : noyau, mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, lysosomes, endosomes et péroxysores (d'après [Alberts et al., 1994]).

Type membranaire	Foie Hépatocyte	Pancréas Cellule exocrine
Membrane plasmique	2	5
RE rugueux	35	60
RE lisse	16	< 1
Appareil de Golgi	7	10
Mitochondries	39	21
Noyau	0.2	0.7
Vésicules de sécrétion	?	3
Lysosomes	0.4	?
Endosomes	0.4	?

TAB. I.2.1: Quantités relatives des différents types membranaires dans deux cellules différentes exprimées en pourcentage de surface totale : hépatocyte (surface totale : 110000 µm²) et cellule exocrine de pancréas (surface totale : 13000 µm²). Les abréviations utilisées sont les suivantes : RE = réticulum endoplasmique, ? = non déterminé (d'après [Alberts et al., 1994]).

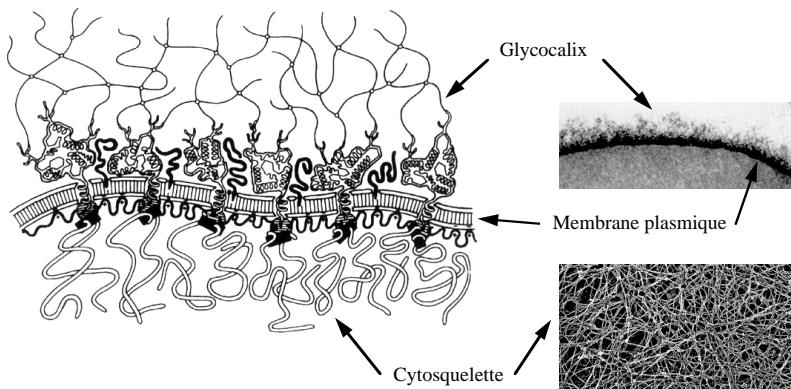


FIG. I.2.2: Schéma et images en microscopie électronique de la membrane plasmique. La membrane est formée par une structure en trois couches : la bicouche lipidique au centre, le glycocalix du côté extérieur et le cytosquelette du côté cytoplasmique (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a] et [Alberts et al., 1994]).

I.2.1.1 Description générale d'une membrane biologique

La membrane plasmique d'une cellule animale est un mélange d'environ 50% de protéines, 40% de lipides et 10% de glucides. Elle est organisée en trois couches distinctes : la bicouche lipidique au centre, le glycocalix du côté extérieur et le cytosquelette du côté cytoplasmique (voir Fig. I.2.2). La bicouche lipidique est formée d'un auto-assemblage de plusieurs types de lipides différents dans lequel peuvent diffuser des protéines qui exercent des fonctions biologiques bien définies (voir ci-dessous). Du côté de la matrice extracellulaire, la bicouche lipidique est recouverte de résidus glucidiques provenant des chaînes latérales de glycolipides membranaires ou de glycoprotéines transmembranaires ou adsorbées. Le glycocalix forme une enveloppe protectrice pour la cellule, mais joue aussi un rôle dans l'adhésion et la reconnaissance cellulaire [Alberts et al., 1994]. Enfin, le cytosquelette, réseau de filaments protéiques le plus souvent tridimensionnel situé à l'intérieur de la cellule, est une structure dynamique couplée à la membrane qui permet de maintenir ou changer la forme de la cellule. La motilité cellulaire et le déplacement des organites internes de la cellule s'effectuent par l'intermédiaire du cytosquelette (voir §I.2.3.3 ci-dessous).

I.2.1.2 Lipides membranaires

Les proportions relatives typiques des différents lipides présents dans la bicouche d'une membrane biologique sont présentées au tableau I.2.2. On trouve essentiellement des phospholipides,

Lipide	Cellule hépatique	Globule rouge	Feuillet externe du globule rouge	Feuillet interne du globule rouge
Chol	17	23	≈ 50	≈ 50
PE	7	18	20	80
PS	4	7	5	95
PC	24	17	80	20
SM	19	18	80	20
Glycolipides	7	3	≈ 0	≈ 100

TAB. I.2.2: Compositions lipidiques de différentes membranes plasmiques cellulaires (deux premières colonnes) : cellule hépatique et globule rouge, en pourcentage massique des lipides totaux. Les deux dernières colonnes illustrent l'asymétrie de composition entre les feuillets interne et externe de la membrane du globule rouge : en pourcentage du type de lipides considéré (d'après [Alberts et al., 1994] et [Shechter, 1993]).

PC, PS, PE, SM (les abréviations utilisées sont données sur le tableau I.1.2), du cholestérol et des glycolipides. La membrane d'une cellule biologique est toujours en phase fluide. La cellule maintient la fluidité de sa membrane en contrôlant la composition de celle-ci : si par exemple la température diminue, la cellule peut synthétiser préférentiellement des lipides à chaînes courtes ou insaturées pour diminuer la température de transition de la membrane. Le cholestérol joue aussi un rôle important dans le maintien de la fluidité membranaire en empêchant les transitions de phase [Bloom et al., 1991].

Des études sur la membrane du globule rouge ont montré que la composition de la bicouche lipidique est asymétrique : les feuillets internes et externes contiennent des lipides de types différents (voir Tab. I.2.2). En particulier, la phosphatidylsérine chargée négativement (PS) est présente exclusivement sur le feuillet interne, alors que les glycolipides sont distribués sur le feuillet externe.

I.2.1.3 Protéines membranaires

La présence de protéines dans la membrane plasmique des cellules peut être visualisée directement par microscopie électronique dans le cas de la membrane du globule rouge (voir Fig. I.2.3). Une protéine est formée d'une succession d'acides aminés, plus ou moins chargés, plus ou moins hydrophobes, et liés entre eux par liaison peptidique. La séquence des acides aminés définit la structure primaire de la protéine. Les interactions entre acides aminés donnent naissance à une organisation de la protéine dans l'espace en feuillets β et/ou en hélices α appelée structure secondaire. Les interactions entre les différents feuillets β et hélices α déterminent la structure tertiaire. Lorsque la protéine est constituée de plusieurs chaînes peptidiques différentes, l'association de ces différentes sous-unités forme la structure quaternaire.

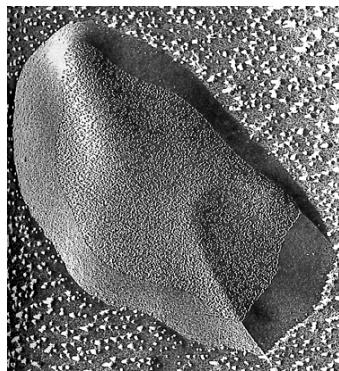


FIG. I.2.3: Image en microscopie électronique par cryofracture de la membrane du globule rouge. Le feuillet externe est visible à la périphérie de la cellule, alors que le feuillet interne apparaît au centre. L'aspect granuleux montre la présence de nombreuses protéines membranaires sur le feuillet interne (d'après [Stryer, 1997]).

Une protéine membranaire peut être associée à la membrane de différentes façons (voir Fig. I.2.4). En général, une séquence d'acides aminés formant une ou plusieurs hélices α ou bien des feuillets β hydrophobes traversent la membrane. La protéine peut aussi être ancrée dans la membrane par l'intermédiaire d'une chaîne lipidique ou bien adsorbée sur d'autres protéines membranaires dans le cas des protéines dites périphériques.

I.2.2 Modèle de la mosaïque fluide et dérivés

Dans les années 1970, des expériences de fusion de membranes cellulaires ont montré que les protéines peuvent diffuser dans la bicoche lipidique (pour une revue, voir [Alberts et al., 1994]). Des expériences de FRAP ont permis de mesurer le coefficient de diffusion D de protéines marquées par une sonde fluorescente. Les valeurs varient selon les protéines : D est typiquement de l'ordre de $10^{-14} - 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Dans le modèle dit de la mosaïque fluide [Singer and Nicolson, 1972], la bicoche apparaît comme un solvant bidimensionnel dans lequel les protéines membranaires diffusent librement (voir Fig. I.2.5). La fluidité de la membrane, la grande variété de lipides présents dans la bicoche ainsi que l'asymétrie de composition entre les deux feuillets permet de fournir un environnement favorable au bon fonctionnement des protéines.

Le modèle simple de la mosaïque fluide a été notamment modifié et amélioré depuis son apparition. De nombreuses protéines membranaires ne diffusent pas librement et sont confinées à l'intérieur de domaines bien spécifiques de la membrane. Des obstacles reliés au cytosquelette pourraient être responsables de ce confinement. Certaines protéines ont même des mouvements

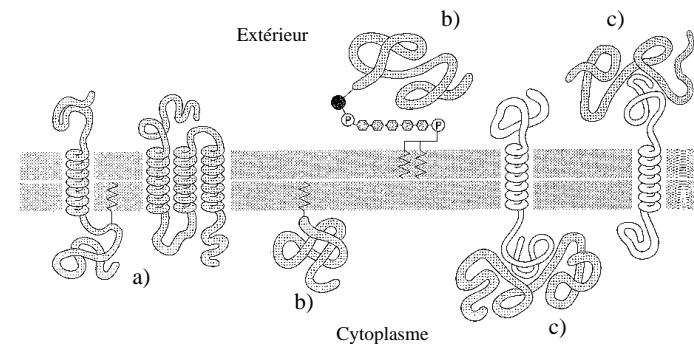


FIG. I.2.4: Différents types d'ancrage d'une protéine dans une bicoche lipidique. a) Ancrage transmembranaire par une ou plusieurs hélices α hydrophobes. b) Ancrage lipidique. c) Protéines adsorbées (d'après [Alberts et al., 1994]).

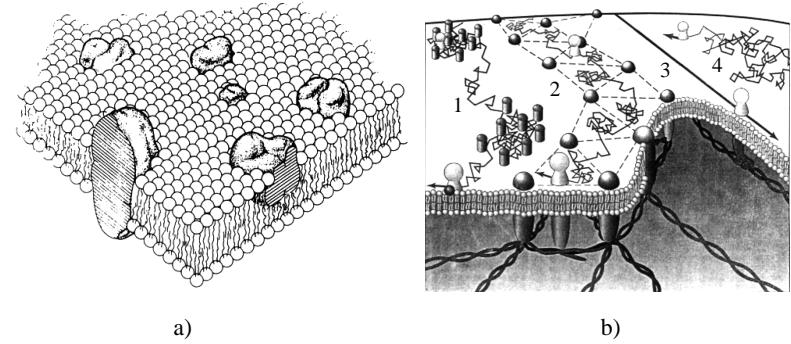


FIG. I.2.5: a) Modèle de la mosaïque fluide : les protéines membranaires diffusent librement dans la bicoche (d'après [Singer and Nicolson, 1972]) b) Modifications du modèle de la mosaïque fluide : 1- et 2- des obstacles liés ou non au cytosquelette peuvent bloquer la diffusion libre des protéines et confiner celles-ci à l'intérieur de domaines, 3- des moteurs moléculaires peuvent diriger le mouvement des protéines, 4- diffusion libre (d'après [Jacobson et al., 1995]).

Ion	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
Na ⁺	5 – 15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0.5	1 – 2
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1 – 2
H ⁺	7 × 10 ⁻⁵	4 × 10 ⁻⁵
Cl ⁻	5-15	110

TAB. I.2.3: Concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de mammifère typique (d'après [Alberts et al., 1994]).

dirigés unidirectionnels, probablement guidés par des moteurs moléculaires liés au cytosquelette [Jacobson et al., 1995] (voir Fig. I.2.5). Avec l'hypothèse récente (et controversée) de l'existence d'agrégats lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides ‘dérivant’ dans la membrane (*rafts*) [Simons and Ikonen, 1997; Jacobson and Dietrich, 1999], la vision de la membrane plasmique s'éloigne encore un peu plus du modèle de la mosaïque fluide : ces ‘radeaux’ joueraient le rôle de plateforme où les protéines pourraient s'associer pour exercer leurs fonctions biologiques.

I.2.3 Activité des membranes biologiques

Les membranes biologiques sont le siège de nombreux phénomènes actifs, c'est-à-dire mettant en jeu une dissipation d'énergie, assurés par le fonctionnement de protéines. La source principale d'énergie d'une cellule biologique est l'énergie chimique stockée dans les molécules de nucléotides triphosphates (en général l'ATP ou le GTP). Mais la cellule peut aussi utiliser les gradients électrochimiques de concentrations de solutés ioniques, ou encore l'énergie lumineuse. Nous avons choisi de décrire quelques exemples particulièrement significatifs du rôle joué par la membrane dans l'activité biologique.

I.2.3.1 Transport transmembranaire de solutés

Le tableau I.2.3 donne les ordres de grandeurs typiques des concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de Mammifère. On voit qu'il existe de forts gradients de concentration à travers la membrane plasmique d'une cellule. Pour maintenir ces différences de concentration, la cellule dispose de plusieurs moyens actifs de régulation du transport des solutés (voir Fig. I.2.6).

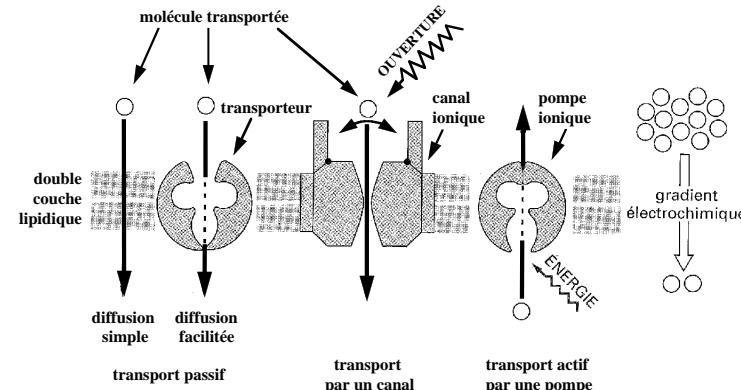


FIG. I.2.6: Différents types de transports à travers une membrane cellulaire. a) Transport passif à travers la bicoche lipidique et transport facilité par un transporteur. b) Transport par un canal ionique. c) Transport actif par une pompe ionique (d'après [Alberts et al., 1994]).

Transport passif

La bicoche lipidique permet les échanges de molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Toute molécule peut diffuser plus ou moins facilement à travers la membrane de façon passive, c'est-à-dire dans le sens de son gradient de concentration. Les petites molécules hydrophobes, comme l'O₂ ou le CO₂, ou neutres, comme l'eau ou l'urée, traversent rapidement la bicoche, alors que celle-ci est pratiquement imperméable aux ions (voir Fig. I.2.7).

Les transports passifs peuvent être facilités par la présence de pores protéiques plus ou moins sélectifs dans la membrane. Par exemple, certaines porines dites ‘non spécifiques’, présentes dans

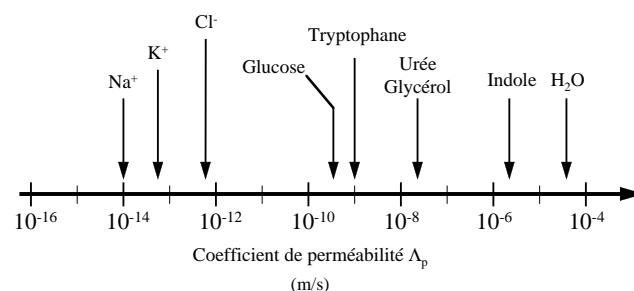


FIG. I.2.7: Coefficients de perméabilité passive à travers une bicoche lipidique cellulaire pour différentes molécules donnés en m/s (d'après [Stryer, 1997]).

la membrane externe des bactéries et dans les membranes des mitochondries et des chloroplastes, peuvent laisser passer l'eau et des solutés hydrophiles de masse moléculaire élevée de façon peu spécifique.

Un deuxième type de transporteurs facilite le passage passif des ions à travers la membrane, sans toutefois former de pore : ces molécules se lient à l'ion à transporter puis diffusent rapidement à travers la membrane en protégeant la charge de l'ion de l'environnement hydrophobe de la membrane. La valinomycine, par exemple, est un ionophore potassique qui facilite le transport des ions K^+ dans le sens du gradient de concentration. L'ionophore A23187 permet le transport des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

Transport par les canaux ioniques

Un canal ionique forme un pore hydrophile en général très sélectif à un ion donné. Contrairement aux pores décrits ci-dessus, un canal ionique fluctue entre un état ouvert et fermé. Il existe trois catégories de canaux ioniques classés en fonction du mécanisme de régulation de l'ouverture du canal : les canaux voltage-dépendants, dont l'ouverture est contrôlée par la différence de potentiel transmembranaire ; les canaux activés par un ligand, qui s'ouvrent lorsqu'un ligand spécifique se lie sur un site précis du canal ; et les canaux activés mécaniquement qui répondent à une stimulation mécanique de la membrane. Lorsqu'il est ouvert, un canal ionique laisse passer les ions dans le sens du gradient de concentration : on parle là encore de 'transport passif' (voir Fig. I.2.6). Cependant, l'ouverture du canal nécessite un apport d'énergie et se traduit par un changement de conformation du canal. Il y a dissipation d'énergie puisque le gradient de concentration initial est diminué après le passage des ions à travers le canal. Il s'agit donc d'un phénomène 'actif' selon la définition utilisée plus haut. Les canaux ioniques ont été étudiés par la technique du *patch-clamp* qui permet d'enregistrer les courants électriques traversant un canal unique. En général, on observe le passage de milliers d'ions en quelques millisecondes.

Les canaux ioniques voltage-dépendants sont responsables, par exemple, de la transmission de l'influx nerveux dans les neurones. La différence de potentiel à travers la membrane plasmique au repos est de l'ordre de -70 mV, et augmente brutalement à 50 mV lors de la dépolarisation accompagnant le potentiel d'action. Les canaux Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} activés par une différence de potentiel sont impliqués dans la génération de ce potentiel d'action.

Les canaux activés par un ligand sont surtout présents au niveau des synapses chimiques : ils convertissent le signal chimique émis par la terminaison nerveuse lors de la libération du ligand en signal électrique dans la cellule postsynaptique. On trouve par exemple des canaux cationiques Na^+ récepteurs à l'acétylcholine ou au glutamate, ou bien des canaux anioniques Cl^- récepteurs au GABA (acide γ -aminobutyrique).

Transport actif par les pompes

Un dernier type de transport est réalisé grâce à des protéines appelées protéines porteuses ou pompes. Ce transport est qualifié de 'transport actif' car il s'effectue cette fois dans le sens opposé au gradient de concentration (voir Fig. I.2.6). Comme dans le cas des canaux ioniques, il s'agit aussi d'un phénomène 'actif' au sens de la définition donnée plus haut puisqu'il nécessite une consommation d'énergie, indispensable pour permettre les changements de conformation de la protéine.

Une grande famille de pompes est celle des pompes ioniques de type P (pour ATP dépendant) dont font partie la $Na^+ - K^+$ ATPase, la Ca^{2+} ATPase, ou la $K^+ - H^+$ ATPase. La $Na^+ - K^+$ ATPase, par exemple, fait entrer deux ions K^+ dans la cellule et sortir trois ions Na^+ grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Elle permet ainsi de maintenir les concentrations respectivement élevées et faibles en ions K^+ et Na^+ à l'intérieur de la cellule (voir Tab. I.2.3) et de contrôler l'équilibre osmotique de la cellule.

D'autres pompes, surtout à Na^+ dans les cellules animales et à H^+ dans les bactéries ou les membranes des organites des cellules animales ou végétales eucaryotes, utilisent l'énergie stockée dans les gradients électrochimiques pour effectuer des cotransport de deux ions, symport lorsque deux ions sont transportés dans le même sens, et antiport dans le cas contraire.

Enfin, des pompes présentes dans la membrane de certaines bactéries peuvent convertir l'énergie lumineuse pour transporter des ions. C'est le cas par exemple de la bactériorhodopsine, une pompe à protons, ou de l'halorhodopsine, une pompe à Cl^- , toutes deux présentes dans la membrane de la bactérie *H. salinarium*.

I.2.3.2 Flux membranaires

Un deuxième exemple de phénomène hors équilibre où la membrane lipidique joue un rôle central est celui des flux et échanges de matériel membranaire dans la cellule. La cellule a besoin de transporter diverses macromolécules vers l'extérieur ou entre les différents organites intracellulaires. Pour cela, elle dispose de tout un réseau de membranes qui lui permet d'encapsuler les différentes macromolécules synthétisées dans des vésicules de sécrétion, de les transporter puis de les libérer dans un organite cible ou bien vers l'extérieur.

La figure I.2.8 représente schématiquement les différents compartiments impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion de macromolécules. Les vésicules de sécrétion sont formées à partir de l'appareil de Golgi par un phénomène de 'bourgeonnement'. Elles sont transportées vers la membrane plasmique ou bien vers des organites appelés endosomes et lysosomes. Le transport des vésicules de sécrétions implique souvent un mouvement dirigé par des moteurs moléculaires guidés le long de filaments du cytosquelette. Enfin, le contenu des vésicules de sécrétion est délivré à l'extérieur de la cellule ou dans les endosomes et lysosomes par un phénomène de 'fusion' membranaire appelé exocytose (voir Fig. I.2.9).

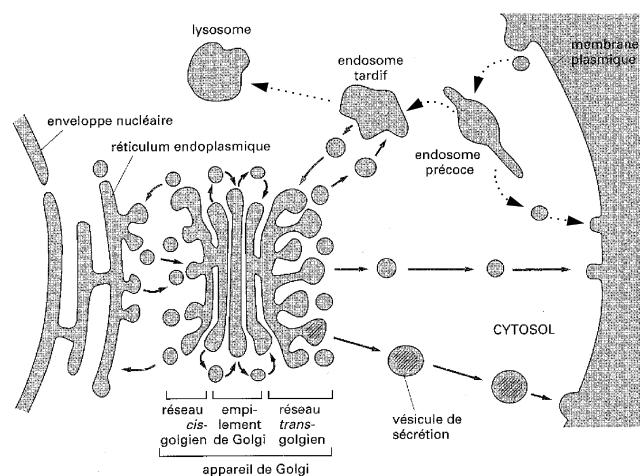


FIG. I.2.8: Représentation schématique des différentes voies de transport dans la cellule. Les voies de sécrétion et d'exocytose mettent en jeu le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (flèches pleines). La voie d'endocytose est symbolisée par des flèches en pointillés (d'après [Alberts et al., 1994]).

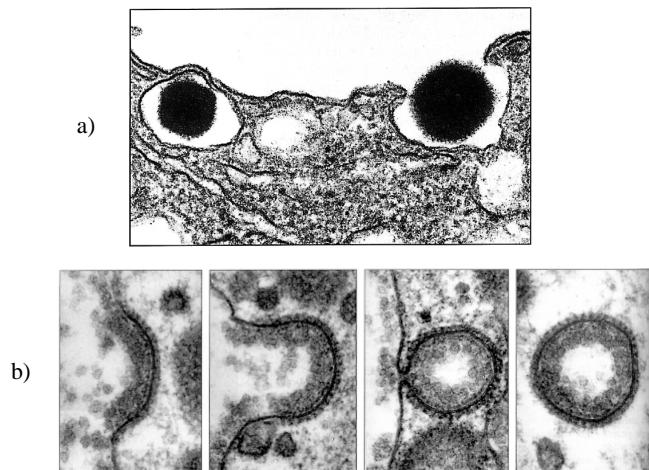


FIG. I.2.9: a) Exocytose de vésicule de sécrétions observée en microscopie électronique. b) En-décytose de vésicules couvertes de clathrine (d'après [Alberts et al., 1994]).

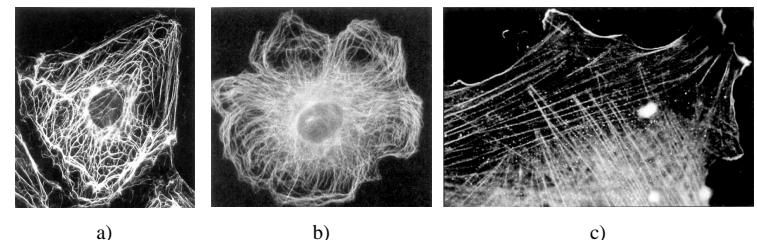


FIG. I.2.10: Différents types de filaments formant le cytosquelette vus en microscopie de fluorescence. a) Filaments intermédiaires. b) Microtubules. c) Filaments d'actine (d'après [Alberts et al., 1994]).

Inversement, il existe une voie de transport depuis la membrane plasmique vers les endosomes, appelée endocytose. Une vésicule est formée à partir de la membrane plasmique et internalise les macromolécules présentes à l'extérieur de la cellule à proximité de la surface cellulaire. L'endocytose s'effectue en général au niveau de zones de la membrane recouvertes de clathrine (*coated pits*) qui s'invaginent rapidement pour former des vésicules recouvertes de clathrine (voir Fig. I.2.9).

I.2.3.3 Adhérence, motilité et signalisation cellulaire

La membrane plasmique est en contact direct avec la matrice extracellulaire. Elle intervient donc lorsqu'une cellule adhère avec une autre ou avec un substrat, ou bien lorsqu'une cellule motile se déplace. Le couplage entre la membrane et le cytosquelette joue un rôle central dans tous ces phénomènes dynamiques.

Le cytosquelette est formé d'un réseau de filaments protéiques polymérisés situé à l'intérieur de la cellule. Trois types de filaments différents constituent ce réseau : les filaments intermédiaires, les microtubules et les filaments d'actine (voir Fig. I.2.10). L'ensemble du cytosquelette permet de maintenir ou de modifier la forme de la cellule, mais les trois types de filaments pris séparément jouent des rôles différents. Les filaments intermédiaires présents dans le volume cytoplasmique sont formés de protéines fibreuses, par exemple la kératine. Ils ont un rôle essentiellement structural en assurant la stabilité mécanique de la cellule. Les microtubules, polymères de tubuline, interviennent entre autre au cours de la division cellulaire : ils croissent à partir du centrosome et contribuent à la séparation de la cellule mère en deux cellules filles. Ils guident aussi les vésicules de sécrétion lors du transport membranaire de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Enfin, les filaments d'actine jouent un rôle central dans l'adhésion et le déplacement de la cellule sur la matrice extracellulaire. Les extrémités des filaments d'actine sont souvent reliés à la membrane plasmique au niveau des plaques adhérence (*focal adhesion*) où sont concentrées de nombreuses molécules d'adhérence (voir Fig. I.2.11). La formation de microvillosités dans les

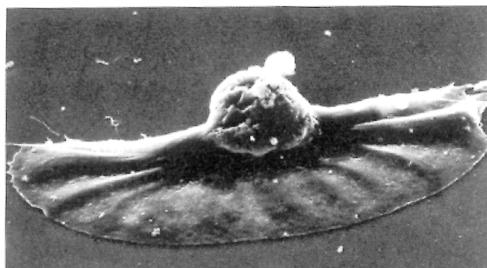


FIG. I.2.11: Image en microscopie électronique d'un kératocyte adhérent se déplaçant sur un substrat (d'après [Alberts et al., 1994]).

cellules épithéliales met aussi en jeu les filaments d'actine.

Un exemple particulièrement simple de cytosquelette est celui du globule rouge : il forme un réseau hexagonal bidimensionnel localisé contre le côté cytoplasmique de la cellule (voir Fig. I.2.12). La spectrine s'assemble en dimères reliés entre eux par des complexes jonctionnels contenant des courts filaments d'actine et plusieurs autres protéines. Le réseau de spectrine est ancré dans la membrane par l'intermédiaire d'un assemblage de deux protéines, l'ankyrine et la protéine transmembranaire bande 3. Les différents points d'ancre dans la bicoche sont séparés d'environ 80 nm. Nous reviendrons sur l'exemple du cytosquelette du globule rouge au paragraphe §I.3.3.2.

Lorsque plusieurs cellules isolées s'assemblent pour former un tissu, les membranes se rapprochent et adhèrent entre elles pour former des jonctions plus ou moins étroites et imperméables. La formation de ces jonctions met en jeu des molécules d'adhérence, principalement de la famille des cadhérines. Il existe trois grands types de jonctions intercellulaires : jonctions serrées (aussi qualifiée d'étanches ou imperméables), jonctions adhérentes (desmosomes ou jonctions d'ancre) et jonctions communicantes (*gap junctions*). La figure I.2.13 montre certaines de ces jonctions présentes dans les cellules épithéliales.

Signalons enfin le rôle joué par la membrane dans la signalisation cellulaire. Les signaux biochimiques sont très souvent transmis par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires à sept hélices α , les récepteurs couplés aux protéines G. Après recrutement des molécules participant à la transduction du signal, les réactions de phosphorylation ou déphosphorylation se produisent donc à proximité immédiate de la membrane plasmique et peuvent impliquer les lipides membranaires (par exemple, lors de l'hydrolyse du phosphatidylinositol PI, ou lors du recrutement des protéines kinases PKC par la phosphatidylsérumine PS et le diacylglycérol).

A travers ces quelques exemples, la membrane d'une cellule biologique apparaît comme un objet très complexe caractérisé par une forte activité hors équilibre. Même si les modèles présentés dans la suite de ce travail n'ont pas la prétention de vouloir rendre compte de toutes les

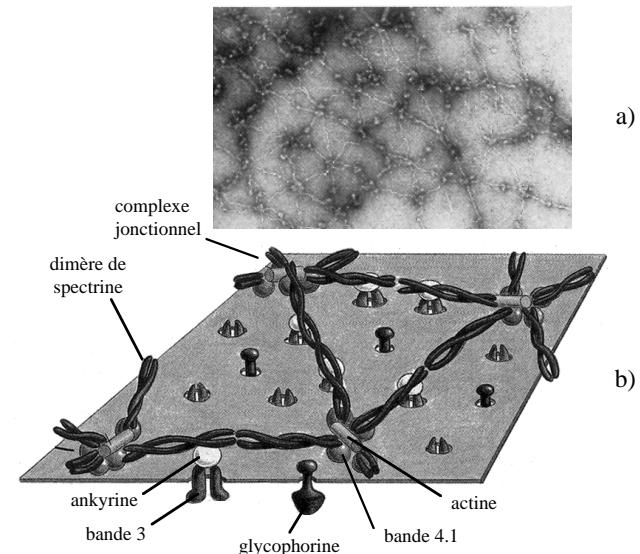


FIG. I.2.12: a) Cytosquelette des globules rouges formant un réseau polymérisé hexagonal du côté cytoplasmique de la membrane visualisé en microscopie électronique (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]). b) Schéma de la membrane du globule rouge : le cytosquelette forme un réseau quasi-hexagonal de dimères de spectrine reliés entre eux par complexes jonctionnels contenant diverses protéines (seules l'actine et la bande 4.1 sont représentées) et connectés à la membrane par l'intermédiaire d'une association de deux protéines, l'ankyrine et la bande 3. La glycophorine peut aussi attacher le cytosquelette à la membrane en se liant aux protéines de la bande 4.1 (non représenté) (d'après [Alberts et al., 1994]).

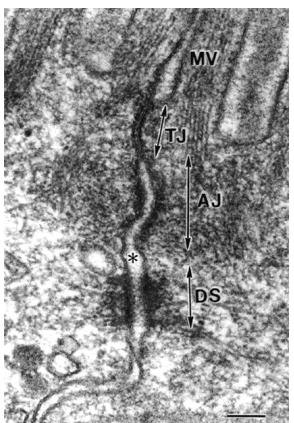


FIG. I.2.13: Image en microscopie électronique d'une cellule épithéliale montrant les trois types de jonctions intercellulaires : jonction serrée (TJ), desmosome (DS) et jonctions adhérentes (AJ). Les microvillosités sont notées MV (d'après [Tsukita et al., 1993]).

propriétés des membranes biologiques, la motivation est quand même directement inspirée par les membranes cellulaires.

Chapitre I.3

Vers un modèle physique de membrane cellulaire

Lorsque des molécules lipidiques s'assemblent, elles peuvent former des vésicules dont la topologie sphérique rappelle de manière évidente celle d'une cellule biologique. Beaucoup d'études ont été menées sur les vésicules lipidiques en vue de modéliser les membranes cellulaires. Au cours des années, les modèles théoriques et les outils expérimentaux se sont précisés et ont permis d'analyser les propriétés physiques de membranes de plus en plus proches des membranes biologiques. Dans les paragraphes suivants, nous allons passer en revue ces différents modèles : membranes simples constituées d'un seul type de lipides éventuellement chargés, membranes mixtes composées de plusieurs types de lipides et de protéines membranaires, membranes polymérisées ou en interaction avec des polymères. Cette revue ne sera évidemment pas exhaustive et l'accent sera particulièrement mis sur les publications plus récentes.

I.3.1 Vésicules lipidiques à un composant

Une simple bicouche lipidique peut se refermer sur elle-même pour former une vésicule sphérique (ou liposome). Elle possède alors la même géométrie qu'une cellule biologique, la géométrie sphérique. La plupart des modèles théoriques décrits au paragraphe §I.1.2 s'appliquent à des membranes planes : il a donc fallu les adapter à la géométrie sphérique. Sur le plan expérimental, la formation de vésicules n'est pas un problème facile à résoudre puisque la phase thermodynamiquement stable est la phase lamellaire alors que la phase vésiculaire est métastable.

I.3.1.1 Différentes catégories de vésicules

Si on évapore le solvant organique dans lequel sont solubilisés les lipides, puis que l'on redisperse les molécules dans l'eau, il se forme spontanément des structures sphériques multilamellaires (MLV pour *MultiLamellar Vesicle*) de taille moyenne de l'ordre de quelques 100 nm mais très

Nom Complet	Nom abrégé	Taille	Méthode de formation
Multi Lamellar Vesicle	MLV	100 nm	Formation spontanée par évaporation du solvant
Small Unilamellar Vesicle	SUV	25 nm	Sonication de MLVs
Large Unilamellar Vesicle	LUV	0.1 – 1 μm	Réversion de phase
Giant Unilamellar Vesicle	GUV	10 – 100 μm	Formation spontanée par hydratation ou Electroformation

TAB. I.3.1: Différentes catégories de vésicules : nom, taille et technique de formation.

polydisperses (pour une revue, voir [Szoka and Papahadjopoulos, 1980] ou [Shechter, 1993]). La sonication de ces MLVs donne naissance à des vésicules unilamellaires plus petites (appelées SUV pour *Small Unilamellar Vesicle*) d'un diamètre de quelques 10 nm. Même si ces SUVs sont constituées d'une bicouche lipidique de forme sphérique comme la membrane d'une cellule, elles sont de trop petite taille pour constituer un bon modèle de membrane biologique. De plus, sur le plan expérimental, elles ne sont pas observables au microscope optique, ce qui limite beaucoup l'intérêt de leur étude. Seules des techniques de microscopie électronique ou de diffusion de lumière peuvent être utilisées.

Il existe plusieurs techniques pour former des vésicules plus grosses, jusqu'à des diamètres de l'ordre de 0.1 μm . L'une d'elles est la technique de réversion de phase : on sonique la solution de lipides dans son solvant organique en présence du solvant aqueux pour former une émulsion puis on évapore lentement le solvant organique. Un gel se forme puis se liquéfie et on obtient des vésicules unilamellaires, appelées LUVs (pour *Large Unilamellar Vesicles*) de taille très polydisperse 0.05 – 1 μm que l'on peut ensuite filtrer pour ne conserver qu'une taille bien définie. Les LUVs atteignent la taille limite de détection d'un microscope optique, mais elles restent petites comparées à une cellule biologique typique.

On peut cependant fabriquer des vésicules lipidiques encore plus grosses et qualifiées de 'géantes', les GUVs (*Giant Unilamellar Vesicle*), de taille typique 10 – 100 μm voisine de la taille caractéristique des cellules biologiques. La technique la plus simple est la formation spontanée de GUVs. Elle consiste à hydrater un film de lipides séché sous vide : au bout de quelques jours, des GUVs apparaissent [Reeves and Dowben, 1969, Mueller et al., 1983]. Cette technique présente l'avantage de permettre la formation de GUVs en milieux salés voire physiologiques [Akashi et al., 1996, Akashi et al., 1998] mais la proportion de vésicules multilamellaires est très importante. Une technique plus sophistiquée est l'électroformation de vésicules géantes [Angelova and Dimitrov, 1987, Angelova et al., 1992]. Un film lipidique est hydraté puis placé sous un champ électrique alternatif de quelques volts. On obtient en deux ou trois heures des vésicules géantes, le plus souvent unilamellaires. Le mécanisme de formation des GUVs par électroformation n'est pas bien compris. L'inconvénient majeur de l'électroformation vient de

l'impossibilité de former des GUVs dans des milieux salés. Cette technique sera détaillée dans la partie expérimentale et dans l'annexe B.

Le tableau I.3.1 résume le classement par taille des différents types de vésicules (SUV, LUV, GUV) et les techniques de formation correspondantes. Ces techniques permettent d'obtenir des membranes contenant un ou plusieurs types de lipide, ou même parfois d'incorporer des protéines. Dans la suite du §I.3.1, nous allons nous intéresser au cas de vésicules dont la membrane ne contient qu'un seul type de lipide. Nous reviendrons sur le cas de membranes mixtes formées de plusieurs catégories de molécules au paragraphe §I.3.2. La plupart des expériences visant à modéliser de façon physique les propriétés des membranes biologiques ont été effectuées à l'aide de vésicules géantes GUVs, la justification principale étant que la géométrie et la taille de ces vésicules sont similaires à celles d'une cellule biologique.

I.3.1.2 Modèles théoriques de vésicules quasi-sphériques fluctuantes

La géométrie sphérique et la topologie fermée d'une vésicule impose des contraintes sur le volume et la surface de la vésicule. Si on considère l'eau comme un fluide incompressible et que l'on suppose la membrane imperméable, le volume d'eau enfermé dans la vésicule fixe le volume V . Le nombre N de molécules de lipides contenues dans la membrane est constant si aucun échange n'est possible avec un quelconque réservoir de lipides. La surface de la vésicule est donc constante $S = N \times s$ où s est la surface par tête polaire des lipides. On peut comparer la surface de la vésicule à celle d'une sphère de rayon R et de même volume V que la vésicule. La forme sphérique minimise la surface à volume donné, donc si $S < 4\pi R^2$, la membrane est étirée élastiquement et la vésicule est sphérique. Si $S > 4\pi R^2$, la vésicule possède plus de surface que la sphère correspondante et sa forme peut ne pas être sphérique : elle peut alors fluctuer autour de la forme sphérique. L'amplitude des fluctuations croît avec la longueur d'onde puisque $\langle u(L)^2 \rangle^{1/2} \propto L$ (voir Eq. I.1.6) : l'utilisation de GUVs permet, grâce à leur taille de l'ordre d'une dizaine de microns, d'obtenir des fluctuations de grande longueur d'onde, observables en microscopie optique. La figure I.3.1 montre un exemple de vésicule quasi-sphérique fluctuante observée en contraste interférentiel (DIC pour *Differential Interference Contrast*). Cependant, comme nous l'avons déjà noté, les fluctuations se font à toutes les échelles de temps et de longueur et la plupart des ondulations sont trop rapides et d'amplitude trop faible pour être détectées par microscopie optique.

Les modèles théoriques reprennent les concepts de base du modèle de 'courbure' développé au paragraphe §I.1.2 en y ajoutant les contraintes de volume et surface constants. On retrouve les mêmes paramètres élastiques μ pour le cisaillement, χ pour la compression, κ pour la courbure (voir Eqs. I.1.1 et I.1.3). La tension σ est reliée à la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule par la loi de Laplace : $\Delta P = 2\sigma/R$, où R est le rayon moyen de la vésicule. Si la vésicule possède un excès de surface par rapport à la forme sphérique, des fluctuations de forme sont possibles à cause de l'agitation thermique. On note u la fluctuation de

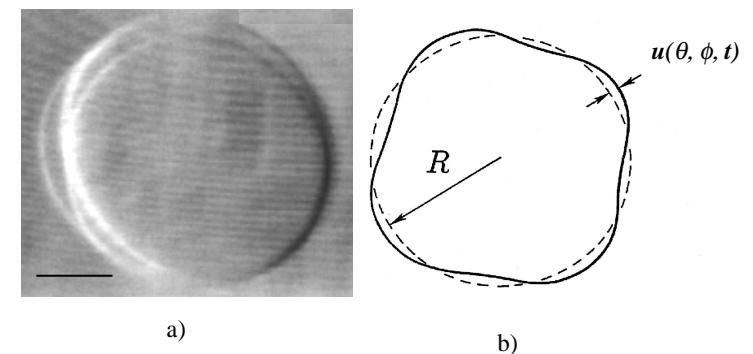


FIG. I.3.1: Vésicule géante fluctuante. a) Images en microscopie optique à contraste interférentiel (DIC) d'une vésicule fluctuante (les trois images ont été prises à des intervalles de temps d'une seconde, la barre représente $10 \mu\text{m}$). b) Schéma correspondant (R est le rayon moyen de la vésicule, $u(\theta, \phi, t)$ est la déviation par rapport à la forme sphérique) (d'après [Yeung and Evans, 1995]).

forme définie par $r(\theta, \varphi, t) = R + u(\theta, \varphi, t)$, où r, θ, φ sont les coordonnées sphériques. On peut ensuite développer u en harmoniques sphériques :

$$u(\theta, \varphi, t) = \sum_{l,m} u_{l,m}(t) Y_{l,m}(\theta, \varphi).$$

La plupart des modèles de vésicules quasi-sphériques fluctuantes tiennent compte principalement du terme d'énergie de courbure H_{courb} . La minimisation du hamiltonien \mathcal{H} permet de déterminer les formes d'équilibre thermodynamique d'une vésicule (voir ci-dessous §I.3.3). Pour décrire l'effet des fluctuations thermiques sur une vésicule quasi-sphérique, le module de courbure κ reste le paramètre essentiel. Pour des petites déviations par rapport à la forme sphérique $u \ll R$, les résultats sont analogues à ceux de la géométrie plane et s'expriment en terme de modes (l, m) de fluctuations au lieu de modes q_- [Schneider et al., 1984b, Engelhardt et al., 1985, Peterson, 1985c, Bivas et al., 1987, Morse and Milner, 1995, Kats et al., 1996]. Les cas de grandes déformations, lorsque les fluctuations thermiques sont importantes et que la forme de la vésicule s'éloigne de la forme sphérique, ont aussi été traités analytiquement [Pieruschka and Wennerström, 1996] et numériquement [Heinrich et al., 1997].

Plusieurs modèles microscopiques de vésicule fluctuante ont été développés récemment par analogie avec le modèle ADE (*Area-Difference-Elasticity*, voir §I.1.3.3). La géométrie sphérique impose une courbure $c = 1/R$ à la membrane et donc une différence de surface entre le feutillet interne et le feutillet externe (voir §I.1.3.3). La courbure spontanée c_0 va donc être un paramètre fondamental pour déterminer les formes d'équilibre de la vésicule (voir ci-dessous §I.3.3). L'étude de la dissipation par friction entre les deux monocouches montre que le rôle dynamique

de la viscosité membranaire n'est pas négligeable [Youhei, 1994; Dörries and Foltin, 1996] à des échelles inférieures au μm [Yeung and Evans, 1995] et que son effet sur le spectre de fluctuations est analogue à une tension de surface [Yeung and Evans, 1995].

L'auto-assemblage de molécules amphiphiles conduisant à la formation de vésicules a été étudié théoriquement à l'aide du modèle de 'courbure' [Safran et al., 1990] et numériquement à l'aide de simulations microscopiques de Monte-Carlo [Bernardes, 1996]. Le cadre théorique du modèle de 'courbure' permet aussi d'étudier la distribution de taille de vésicules dans une phase diluée de vésicules et son évolution temporelle (voir par exemple [Morse and Milner, 1994; Morse and Milner, 1995; Somoza et al., 1996; Golubovic and Golubovic, 1997]).

Les modèles théoriques de vésicules quasi-sphériques fluctuantes décrits ci-dessus présentent l'avantage de pouvoir être testés expérimentalement (voir §I.3.1.1). Nous allons illustrer ceci par quelques exemples dans les paragraphes suivants.

I.3.1.3 Changements de forme

La membrane d'une cellule biologique peut se déformer et prendre une grande variété de morphologies, comme par exemple lors des phénomènes d'exocytose, d'endocytose ou de fusion membranaire (voir §I.2.3.2), lors de l'adhérence ou de la locomotion cellulaire ou encore dans le cas de globules rouges dans le flux sanguin... Les vésicules à un composant constituent le modèle le plus simple possible pour étudier les différentes morphologies d'une bicouche lipidique, tout en permettant des comparaisons avec le cas biologique.

Formes d'équilibre et fluctuations

Les formes d'équilibre sont prévues par minimisation du hamiltonien \mathcal{H} . Même si la forme sphérique minimise en général l'énergie, toute une zoologie de formes d'équilibre peut être calculée en fonction de différents paramètres [Deuling and Helfrich, 1976], [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 403], comme par exemple le volume et la surface de la vésicule, la courbure spontanée de la membrane ou la température... On obtient différents diagrammes de phases en fonction du niveau d'élaboration du modèle utilisé.

Sans courbure spontanée ($c_0 = 0$), les formes d'énergie de courbure minimales ne dépendent que du volume adimensionné $v = V/(\frac{4}{3}\pi R^3)$. On trouve par ordre de volume adimensionné décroissant les formes suivantes : sphère, ellipsoïde et huitième prolate, ellipsoïde et discocyte oblate, stomatocyte (voir Fig. I.3.2). Remarquons la ressemblance entre la forme biconcave du discocyte et celle du globule rouge (voir §I.3.2).

Si la membrane possède une courbure spontanée ($c_0 \neq 0$), le diagramme de phase dépend du volume adimensionné v et de la courbure spontanée adimensionnée $c_0 \times R$. Comme le montre la figure I.3.3, une courbure spontanée négative favorise les formes oblates alors que pour une courbure spontanée positive une forme nouvelle en 'poire' apparaît.

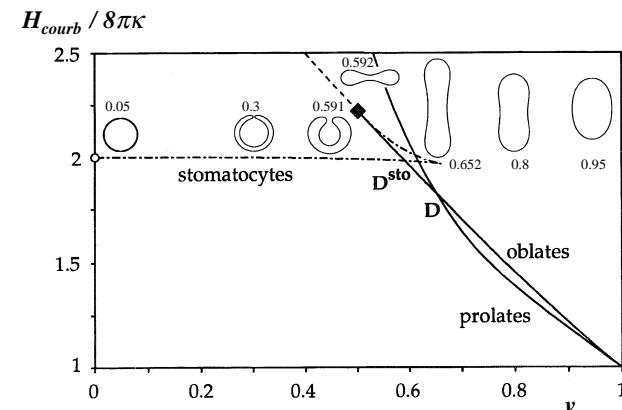


FIG. I.3.2: Diagramme de phase du modèle de courbure, sans courbure spontanée, représentant l'énergie de courbure H_{courb} en fonction du volume adimensionné $v = V/(\frac{4}{3}\pi R^3)$. Différentes formes de même surface et de volumes adimensionnés croissants sont indiquées sur le diagramme. La ligne notée D^{sto} représente la transition discontinue stomatocyte/oblate et la ligne D représente la transition discontinue oblate/prolate (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

Dans le modèle plus complet ADE (*Area-Difference-Elasticity*) où la structure microscopique de la bicouche est prise en compte via le module élastique de courbure non locale $\bar{\kappa}$ (voir §I.1.3.3), le diagramme de phase est tridimensionnel et peut être tracé en fonction du volume sans dimension v , de la différence d'aire adimensionnée à l'équilibre $\Delta a_0 = \Delta A_0/(8\pi R \times e)$ où e est l'épaisseur de la membrane et du rapport entre les deux modules élastiques $\bar{\kappa}/\kappa$ [Jaric et al., 1995; Döbereiner et al., 1997a]. La figure I.3.4 illustre les différentes phases du modèle ADE. Certaines transitions prévues par ce diagramme de phase ont été étudiées plus en détail, comme par exemple la transition prolate-oblate [Heinrich et al., 1993; Jaric et al., 1995; Döbereiner and Seifert, 1996; Hellal et al., 1999], ou la transition prolate-'poire' [Döbereiner et al., 1997a], pouvant aboutir à une transition de 'bourgeonnement' (*budding transition*) où une petite vésicule 'fille' est expulsée de la vésicule 'mère' (voir Fig. I.3.5). Ce phénomène de 'bourgeonnement' décrit ici pour des vésicules lipidiques à un composant rappelle la formation de vésicules de sécrétion à partir de l'appareil de Golgi des cellules biologiques (voir §I.2.3.2). Nous verrons par la suite que le 'bourgeonnement' n'est pas seulement une conséquence de fortes fluctuations de forme de la vésicule mais qu'il peut être provoqué et contrôlé sous certaines conditions.

Dans tous les exemples cités jusqu'à présent, la forme de la vésicule fluctue autour d'une forme moyenne axisymétrique. Le modèle de courbure avec un terme de courbure spontanée non nulle et le modèle ADE permettent aussi d'obtenir numériquement des vésicules de formes d'équilibre

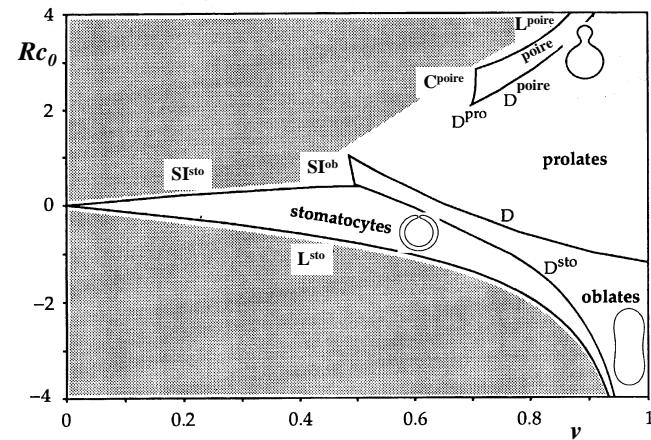


FIG. I.3.3: Diagramme de phase du modèle de courbure, avec courbure spontanée, représentant la courbure spontanée adimensionnée Rc_0 en fonction du volume adimensionné $v = V/(4/3\pi R^3)$. Les lignes notées C et D représentent des transitions respectivement continues et discontinues. Les lignes L correspondent à des formes limites où la vésicule est séparée en deux compartiments reliés par un ‘cou’ infinitésimal. Au-delà des lignes SI^{sto} et SI^{ob} , les formes obtenues se recoupent et ne sont pas physiques. Dans les parties grisées du diagramme, les formes d’énergie minimale ne sont pas encore connues (d’après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

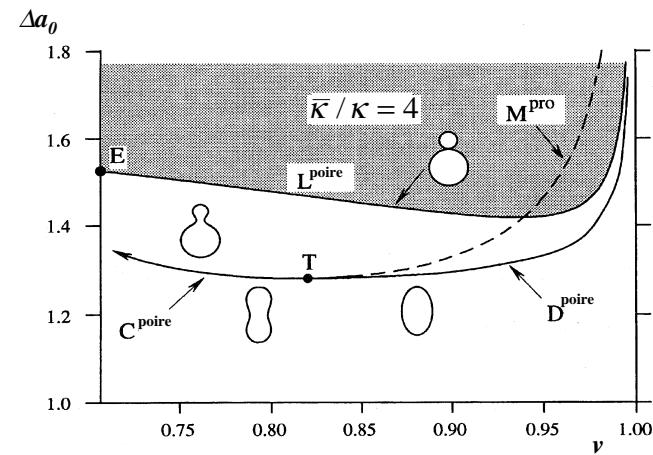


FIG. I.3.4: Diagramme de phase du modèle ADE représentant la différence d’aire adimensionnée $\Delta a_0 = \Delta A_0/(8\pi R \times e)$ en fonction du volume adimensionné $v = V/(4/3\pi R^3)$ pour $\bar{\kappa}/\kappa = 4$. Les significations des lignes notées C, D, L sont les mêmes qu'à la figure précédente. La ligne M^{pro} indique une zone de métastabilité de la forme prolate. Le point triple T sépare les transitions continue C^{poire} et discontinue D^{poire} . Dans les parties grises du diagramme, les formes d’énergie minimale ne sont pas encore connues (d’après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

non-axisymétriques [Heinrich et al., 1993, Jie et al., 1998]. Si la vésicule est suffisamment dégonflée, c'est-à-dire si le volume adimensionné v de la vésicule est suffisamment faible, le modèle ADE prévoit l'existence de vésicules en ‘étoiles de mer’ (*starfish vesicles*). Ces topologies étonnantes ont été observées numériquement et expérimentalement (voir Fig. I.3.5) [W.Wintz et al., 1996].

Changements de formes induits par une contrainte extérieure

Lorsqu'une vésicule quasi-sphérique est soumise à une contrainte extérieure, sa réponse élastique peut conduire à un changement de forme : la forme initiale est destabilisée puis la vésicule relaxe vers une nouvelle forme. Sur le plan thermodynamique, les changements de morphologie considérés ici sont différents de ceux du paragraphe précédent puisqu'ils sont induits par des phénomènes hors équilibre.

L'exemple le plus classique est celui de vésicules soumises à un cisaillement hydrodynamique. Dans le cas d'un flux stationnaire, des simulations numériques ont montré qu'une vésicule quasi-sphérique devient elliptique en inclinant son axe principal par rapport à la direction du flux et que la membrane tourne dans un mouvement de ‘chenille’ (*tanktreading*) [Kraus et al., 1996, Seifert, 1999]. Des expériences sur des vésicules géantes ont confirmé ces prévisions [de Haas et al., 1997] et ont montré que pour des cisaillements forts, les vésicules s'allongent et donnent naissance à des tubules et des longs filaments [Shahidzadeh et al., 1998]. Pour des vésicules de forme biconcave, analogue à celle du globule rouge, dans un cisaillement, on retrouve l'inclinaison et le mouvement de ‘chenille’ [Peterson, 1992]. Le cas particulier de vésicules soumises à un écoulement capillaire constitue un modèle simple pour la déformation de globules rouges dans le flux sanguin [Bruinsma, 1996, Hellal et al., 1999]. La déformation de vésicule dans un flux hydrodynamique fournit aussi un cadre théorique pour l'interprétation d'études d'adhérence de cellules par cytométrie de flux [Bongrand et al., 1994].

Les vésicules tubulaires cylindriques (‘tubules’, filaments ou *tether*), formées sous un fort écoulement hydrodynamique (voir ci-dessus, [Shahidzadeh et al., 1998]) ou par traction mécanique (*tether pulling*) [Bo and Waugh, 1989, Bukman et al., 1996], peuvent être destabilisées par une contrainte mécanique et former un ‘collier de perles’ par un mécanisme analogue à l'instabilité de Rayleigh pour un jet liquide (*pearling instability*). Cette instabilité peut être induite par l'action d'un laser de pinces optiques [Bar-Ziv and Moses, 1994, Bar-Ziv et al., 1997] ou par un étirement mécanique [Xu and Döbereiner, 1999] (voir Fig. I.3.5). Ces expériences ont donné suite à de nombreux travaux théoriques qui ont permis de comprendre le rôle de la tension latérale dans le développement et la propagation de l'instabilité [Nelson and Powers, 1995, Goldstein et al., 1996, Olmsted and MacIntosh, 1997, Powers et al., 1998].

Un changement de température peut aussi avoir des conséquences sur la forme d'une vésicule et provoquer par exemple une transition discocyte-stomatocyte ou une transition de ‘bourgeonnement’ (voir Fig. I.3.5) [Berndl et al., 1990]. Ces effets de la température sont bien interprétés par le modèle ADE en supposant que les coefficients d'expansion thermique des deux bicouches sont

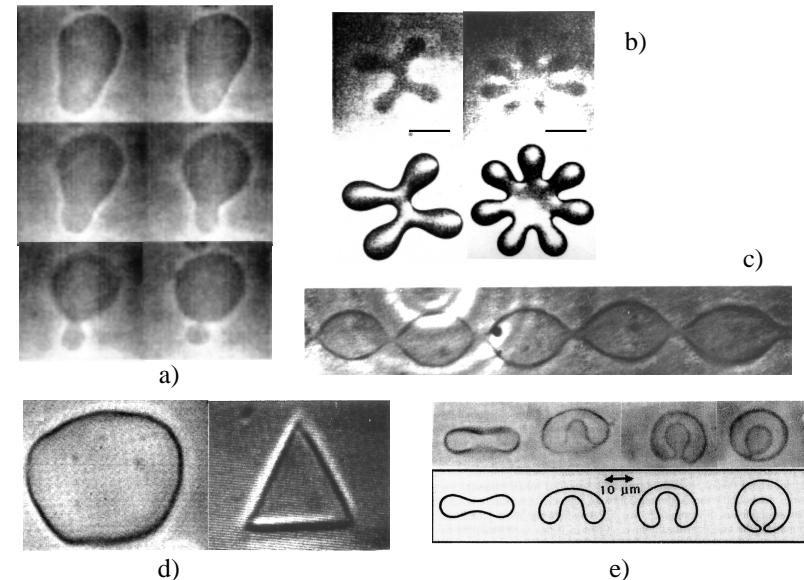


FIG. I.3.5: Différentes formes et changements de formes de vésicules de topologie sphérique. a) ‘Bourgeonnement spontanné’ (d'après [Döbereiner et al., 1997a]). b) Vésicules en ‘étoiles de mer’ : observations en microscopie à contraste de phase (la barre représente 5 µm) comparées aux formes obtenues numériquement (d'après [W.Wintz et al., 1996]). c) Instabilité de Rayleigh d'une vésicule tubulaire (d'après [Bar-Ziv and Moses, 1994]). d) Exemple de changement de forme observé lorsque la température est diminuée sous la température de transition de phase (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]). e) Changements de forme obtenus par augmentation de la température observés en contraste de phase et comparés aux simulations numériques : transition discocyte-stomatocyte (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

légèrement différents à cause de la présence d'impuretés. De plus, si la température est diminuée de façon à passer sous la température de transition de phase des lipides, on s'attend là encore à des changements de morphologie. Au niveau microscopique, des simulations de Monte-Carlo ont montré que le gel (*freezing*) d'une membrane flexible aboutit à un état hexatique comportant un nombre fini de défauts topologiques [Gompper and Kroll, 1997a, Gompper and Kroll, 1997b]. La forme macroscopique de la vésicule dans l'état gelé dépend fortement du type de lipide utilisé (voir Fig. I.3.5) [Sackmann, 1994].

Enfin, la pression osmotique joue, elle aussi, un rôle dans la morphologie des vésicules. Des formes polygonales peuvent être simulées numériquement en gonflant une vésicule disococyte biconcave [Naito and Okuda, 1996]. Si une contrainte mécanique est imposée par une pince optique sur une vésicule contenant une vésicule plus petite, la vésicule ‘fille’ est expulsée [Moroz et al., 1997] : cet effet d’exocytose est interprété par un changement de pression osmotique dû à l’expulsion de molécules de lipides lors de l’application du laser sur la membrane de la vésicule ‘mère’.

I.3.1.4 Topologies non triviales

Le modèle de courbure contient un terme de courbure gaussienne $\kappa_G c_1 c_2$ (voir §I.1.2.1) que l'on doit prendre en compte si on s'intéresse à des changements de topologie. D'après le théorème de Gauss-Bonnet, le terme d'énergie supplémentaire dû à la courbure gaussienne est :

$$\int_A \kappa_G c_1 c_2 dS = 4\pi\kappa_G(1-g),$$

où g est le genre topologique de la surface, c'est-à-dire le nombre de trous ou de poignées ($g = 0$ pour une sphère, $g = 1$ pour un tore). On peut alors, en minimisant l'énergie, déterminer les formes d'équilibre de vésicules de topologie non triviale. Le modèle ADE permet encore une fois d'obtenir le diagramme des différentes phases prévues pour des surfaces de genres 1 et 2 [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 430]. Certaines de ces formes, comme par exemple des tores axisymétriques ou non, des vésicules de genre 2 ou de genre plus élevé formé de multiples passages intermembranaires ont été prévues théoriquement et observées à la fois numériquement [Jülicher and Lipowsky, 1993, Jülicher, 1996, Charitat and Fourcade, 1997] et expérimentalement (voir Fig. I.3.6) [Michalet et al., 1994].

I.3.1.5 Mesures du module de courbure

Le module de courbure κ est le paramètre central du modèle de courbure décrit plus haut (voir §I.1.2). Son rôle est déterminant dans l'analyse du phénomène de fluctuations thermiques de vésicules peu tendues : plus le module de courbure est faible, plus les fluctuations de forme de la vésicule sont grandes (voir Eq. I.1.5). Il est donc important d'en connaître la valeur. Le tableau I.1.1 donnait quelques ordres de grandeur de κ pour différents matériaux. Nous allons ici préciser ces ordres de grandeur dans le cas particulier de bicouches lipidiques.

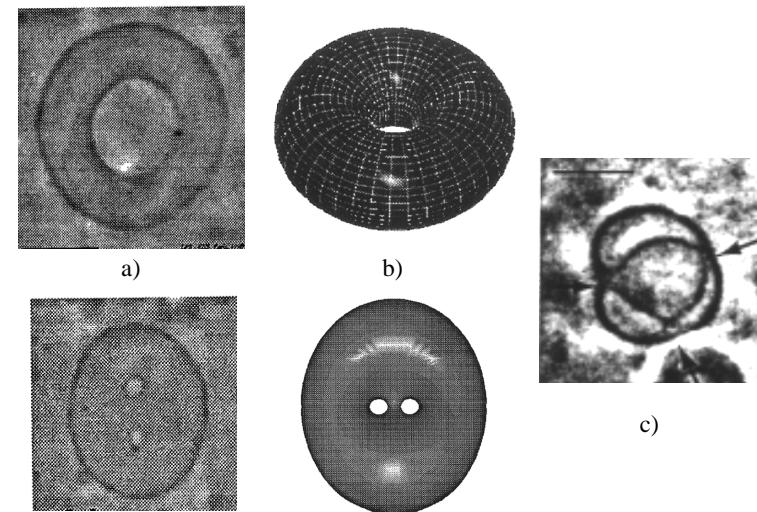


FIG. I.3.6: Exemples de vésicules de topologies non sphériques et simulations numériques. a) Tore. b) ‘Bouton’ à deux trous (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a] et [Jülicher, 1996]). c) Vésicule de genre supérieur à 2 (d'après [Michalet et al., 1994]).

Techniques expérimentales

Il existe de nombreuses techniques expérimentales pour mesurer κ . On peut les classer en deux grandes catégories : les techniques basées sur l'analyse des fluctuations de forme de vésicules quasi-sphériques libres et les techniques où on étudie la réponse élastique à une déformation mécanique de la membrane.

A cause de la relativement faible rigidité de la bicouche lipidique, les fluctuations de forme d'une membrane sont visibles au microscope optique (voir Fig. I.3.1). En combinant la détection optique du contour de la vésicule et une analyse de Fourier rapide des images, on peut déduire le module de courbure à partir du spectre de fluctuations. Plusieurs techniques de détection ont été développées : microscopie de fluorescence [Schneider et al., 1984b], contraste de phase [Engelhardt et al., 1985, Faucon et al., 1989, Niggemann et al., 1995, Strey et al., 1995], microscopie en lumière pulsée [Méléard et al., 1992].

Une méthode interférentielle, le contraste interférentiel par réflexion, (RICM, *Reflection Interference Contrast Microscopy*), elle aussi basée sur l'analyse de Fourier, permet de visualiser les fluctuations de la distance séparant une membrane d'une paroi et de déduire les paramètres élastiques [Zilker et al., 1987, Zilker et al., 1992, Rädler et al., 1995b]. Elle a l'avantage de donner des renseignements sur toute la surface de la vésicule qui se trouve à proximité de la paroi et pas seulement sur le contour de la vésicule : on utilise donc la géométrie plane et non plus sphérique pour faire la décomposition en modes de Fourier. En revanche, les interactions avec la paroi doivent être prises en compte dans l'analyse des fluctuations (voir §I.1.2.3). La technique de RICM sera détaillée dans l'annexe D.

L'analyse de Fourier a aussi permis de déterminer le module de courbure κ de vésicules tubulaires cylindriques ou de morceaux plans de membrane [Schneider et al., 1984a, Mutz and Helfrich, 1990].

Si une force extérieure est appliquée à une membrane, celle-ci se déforme élastiquement et sa réponse dépend de ses paramètres élastiques. En choisissant le type adéquat de déformation, on peut ainsi déduire le module de courbure κ . Pour des fortes déformations, les fluctuations peuvent être négligées. On déduit directement le module de courbure par une équation d'équilibre entre les différentes forces ; c'est le cas par exemple pour des filaments lipidiques (*tether*) étirés à partir d'une vésicule aspirée dans une micropipette [Bo and Waugh, 1989, Bukman et al., 1996]. Pour des faibles déformations, les fluctuations interviennent. La force extérieure contrôle la tension de la vésicule, et à partir de la relation entre la tension et l'excès de surface stocké dans les fluctuations (voir §I.1.2.2, Eq. I.1.11), on peut remonter à la valeur de κ :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma_i}{\sigma}$$

De telles déformations peuvent être créées par aspiration dans une micropipette [Evans and Needham, 1987, Evans and Rawicz, 1990], par l'action d'un champ électrique alternatif [Kummrow and Helfrich, 1991, Niggemann et al., 1995, Méléard et al., 1998], ou par celle

d'un champ magnétique sur une vésicule remplie de ferrofluide [Bacri et al., 1996].

Résultats

Les techniques décrites au paragraphe précédent ont permis de déterminer la valeur du module de courbure pour un grand nombre de lipides différents. Le tableau I.3.2 regroupe les résultats trouvés avec ces différentes méthodes. On peut remarquer que, pour un même lipide, les valeurs diffèrent sensiblement d'une méthode à l'autre. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces différences, comme par exemple des différences de pureté des lipides utilisés, ou encore l'existence d'un excès de surface 'caché' dans une superstructure membranaire complexe [Helfrich, 1989, Niggemann et al., 1995]. Cette dernière hypothèse n'a cependant pas été confirmée expérimentalement.

Les études montrant des changements du module de courbure par variation d'un paramètre sont nombreuses. Comme on peut s'y attendre intuitivement, lorsque la température diminue, le module de courbure κ augmente, indiquant une rigidification de la membrane si on approche la température de transition [Niggemann et al., 1995, Méléard et al., 1997].

Le vieillissement des vésicules induit une diminution du module de courbure, certainement à cause de la dégradation des lipides au cours du temps aboutissant à la perte d'une chaîne hydrocarbonée et à la formation de lysolipides [Angelova et al., 1992, Méléard et al., 1992].

Enfin, les études sur les membranes mixtes, constituées de plusieurs types de molécules différents (voir §I.3.2 ci-dessous), ont montré que l'incorporation de cholestérol (Chol) rigidifie la membrane, alors que l'introduction de quelques pourcents de lipides bipolaires (bola) ou bien de petits peptides ionophores, comme l'ionophore potassique valinomycine (val) ou l'ionophore calcique A23187, diminue fortement le module de courbure [Duwe et al., 1990, Häckl et al., 1997] (voir Tab. I.3.2). Le module de courbure devient alors de l'ordre de kT , sans pour autant que soit observée expérimentalement la transition de froissage (voir §I.1.2.2 et Fig. I.1.9) observée numériquement lorsque $\kappa \rightarrow 0$ [Leibler et al., 1987, Kroll and Gompper, 1992].

I.3.1.6 Membranes chargées

De nombreux lipides constituant les membranes biologiques possèdent des charges électriques : certains sont zwitterioniques (PC, PE) mais d'autres sont chargés, le plus souvent négativement (PA, DGDG, PS, PI) (voir Fig. I.1.2, p. 5 et Tab. I.2.2, p. 38). Les propriétés électrostatiques des membranes cellulaires jouent un rôle important dans le transport de molécules chargées à travers la membrane, ou bien dans l'interaction entre une cellule et son environnement, ou encore lors de l'adhérence cellulaire. Cependant, il faut noter qu'un milieu biologique contient le plus souvent de fortes concentrations en sel : dans une cellule de mammifère par exemple, les concentrations ioniques sont typiquement de l'ordre de 10 – 100 mM (voir Tab. I.2.3, p. 41). Les interactions électrostatiques sont donc en partie écrantées. Les membranes lipidiques modèles constituées d'un

Lipide	Température (°C)	Module de courbure κ (10^{120} J)	Technique expérimentale	Référence
GDG	-	1.5 – 4	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
DGDG	-	1.2 – 2.7	Fourier (membranes planes)	[Mutz and Helfrich, 1990]
DGDG	23	4.4 ± 0.3	Micropipette	[Evans and Rawicz, 1990]
DGDG	-	1 ± 0.2	Champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]
DGDG	amb	0.8 – 1	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1998]
DLPC	-	3.4 ± 0.7	Champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]
DLPC	amb	9.1 ± 0.1	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1998]
DMPC	-	10 – 20	Fourier (tubulaire)	[Schneider et al., 1984a]
DMPC	30	11.5 ± 1.5	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
DMPC	29	5.6 ± 0.6	Micropipette	[Evans and Rawicz, 1990]
DMPC	26	11.6 ± 1.7	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
DMPC	26	11 ± 0.8	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1997]
DMPC+10% Chol	30	20 ± 1	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1997]
DMPC+20% Chol	30	21 ± 2.5	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
DMPC+30% Chol	30	40 ± 8	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
DMPC+30% Chol	30	41 ± 2.5	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1997]
DMPC+50% Chol	30	61 ± 3	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1997]
DMPC+2% Bola	-	0.2 – 0.4	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
DMPC+1% Val	26	6 ± 1	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
DMPC+5% Val	26	3 ± 0.6	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
DMPC+5% A23187	26	7 ± 3	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
POPC	-	2.5 ± 0.5	Champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]
POPC	26	14.3 ± 2.2	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
SOPC	18	20	Filaments lipidiques	[Bo and Waugh, 1989]
SOPC	18	9 ± 0.6	Micropipette	[Evans and Rawicz, 1990]
SOPC	26	14.4 ± 3.5	Fourier (quasi-sphérique)	[Häckl et al., 1997]
SOPC	amb	12.7 ± 0.7	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1998]
SOPC	amb	18.1 ± 1.9	Fourier (quasi-sphérique)	[Gerbeaud, 1998]
SOPC+0.5% GramD	amb	13.2 ± 0.8	Fourier (quasi-sphérique)	[Gerbeaud, 1998]
SOPC+0.03% BR	amb	14.8 ± 0.9	Fourier (quasi-sphérique)	[Gerbeaud, 1998]
SOPC+Chol	15	24.6 ± 3.9	Micropipette	[Evans and Rawicz, 1990]
EPC	-	10 – 20	Fourier (quasi-sphérique)	[Schneider et al., 1984b]
EPC	-	4 – 5	Fourier (quasi-sphérique)	[Faucon et al., 1989]
EPC	-	11.5 ± 1.5	Fourier (quasi-sphérique)	[Duwe et al., 1990]
EPC	-	8	Fourier (membranes planes)	[Mutz and Helfrich, 1990]
EPC	-	2.5 ± 0.5	Champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]
EPC	amb	6.6 ± 0.6	Fourier (quasi-sphérique)	[Méléard et al., 1998]

TAB. I.3.2: Valeurs expérimentales du module de courbure κ pour différents lipides. Les abréviations utilisées sont : amb = température ambiante, GramD = gramicidine D, BR = bactériorhodopsine, les autres sont données dans le texte.

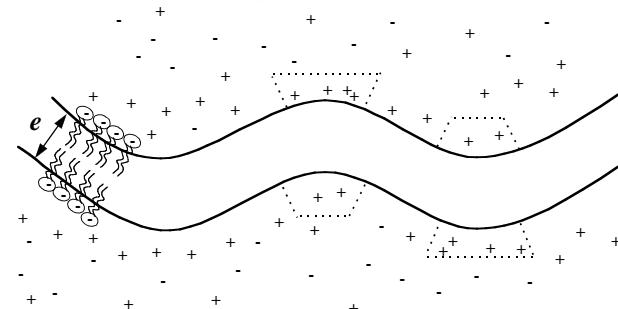


FIG. I.3.7: Fluctuations d'une membrane chargée : le volume accessible aux ions par unité de surface de la membrane est plus grand dans les parties convexes que dans les parties concaves (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995b]).

seul type de lipide chargé ont été étudiées dans le cadre de la théorie de Poisson-Boltzmann pour mettre en évidence les effets des interactions électrostatiques sur les propriétés de membranes fluctuantes [Lipowsky and Sackmann, 1995b, article de D. Andelman, p. 603].

Pour une membrane isolée, la présence de charges tend à aplatiser la membrane et à diminuer l'amplitude des fluctuations. En effet, les ondulations provoquent un excès de contre-ions par unité de surface dans les zones convexes et un défaut de contre-ions dans les zones concaves par rapport à la densité moyenne de contre-ions (voir Fig. I.3.7). Ces différences de densité locale en contre-ions augmentent l'énergie du système et défavorisent les ondulations de la membrane. On s'attend donc à ce que la contribution des forces électrostatiques au module de courbure élastique $\delta\kappa_{el}$ soit positive et rigidifie la membrane. Différentes hypothèses et conditions aux limites ont été utilisées pour calculer $\delta\kappa_{el}$, par exemple l'approximation de Debye-Hückel, avec ou sans couplage électrostatique entre les deux monocouches. On trouve (voir par exemple [Bensimon et al., 1990]) :

$$\delta\kappa_{el} = c \frac{\sigma^2 \lambda_D^3}{\epsilon_w} > 0, \quad (I.3.1)$$

où σ est la densité surfacique de charge de la membrane, $\lambda_D = 1/\sqrt{8\pi n_0 q_e^2/\epsilon_w kT}$ est la longueur de Debye, $\epsilon_w \simeq 80$ est la constante diélectrique de l'eau, q_e est la charge élémentaire, n_0 est la concentration ionique de la solution. La constante numérique c est toujours positive mais dépend des hypothèses utilisées : $c = 3\pi/2$ sans couplage [Goldstein et al., 1990, Duplantier et al., 1990, Winterhalter and Helfrich, 1988], $c = \pi/2$ avec couplage [Duplantier et al., 1990, Winterhalter and Helfrich, 1992]. L'effet des interactions électrostatiques est donc bien de rigidifier la membrane.

Lorsque deux ou plusieurs membranes chargées sont en présence, les forces électrostatiques modifient les interactions entre les membranes. Si on tient compte uniquement des forces électrostatiques

trostatiques non écrantées et de la force répulsive de Helfrich (voir §I.1.2.3), les fluctuations sont fortement diminuées et la force de Helfrich devient négligeable [Pincus et al., 1990]. Si la densité de charges peut fluctuer, les forces entre deux membranes de même charge peuvent même donner naissance à des interactions attractives [Pincus and Safran, 1998].

Enfin, le phénomène de flexoélectricité, bien connu pour les cristaux liquides, a aussi été prévu pour les membranes lipidiques [Petrov, 1984]. Lorsqu'une membrane polarisée est courbée, un courant électrique apparaît à cause des variations de polarisation. Cet effet a été mis en évidence expérimentalement dans des bicouches planes (BLM) soumises à des oscillations de pression hydrostatique [Petrov, 1984].

I.3.2 Vésicules lipidiques mixtes

Les membranes biologiques sont bien plus complexes qu'une simple bicouche contenant un seul type de lipides. Elles sont formées d'un mélange de différents lipides qui constituent un solvant pour des molécules hydrophobes ou des protéines membranaires (voir §I.2.2 et Tab. I.2.2). Les interactions entre lipides de natures différentes, entre lipides et protéines et entre protéines elles-mêmes ont un rôle à la fois structurel et fonctionnel au niveau de la cellule et ont été étudiées dans divers systèmes modèles : vésicules composées de plusieurs catégories de molécules différentes, mélange de lipides, protéines ou inclusions.

I.3.2.1 Mélanges de lipides

Les lipides peuvent différer par la nature de leur tête polaire (charge, moment dipolaire...), par le degré d'insaturation ou la longueur de leurs chaînes hydrocarbonnées. Lorsque plusieurs lipides sont mélangés, on peut obtenir des diagrammes de phases complexes en fonction de la température et des concentrations respectives des lipides. Même pour des mélanges de lipides en monocouches, ces diagrammes de phases ne sont en général pas connus. On s'attend à ce que les lipides soient miscibles à température élevée, et à ce qu'une séparation de phase se produise à plus basse température, avec l'apparition de domaines de compositions différentes [Gebhardt et al., 1977]. Les phases en coexistence peuvent être fluides ou ordonnées, en fonction de la composition du mélange et des températures de transition de chaque lipide.

Un cas particulier est celui du mélange binaire de deux lipides différents présentant une coexistence de deux phases fluides, par exemple, les mélanges de DEPC/DPPC [Wu and MacConnel, 1975] ou DMPC/cholestérol et DPPC/cholestérol [Evans and Needham, 1986, Bloom et al., 1991]. L'énergie élastique d'une membrane comportant deux phases ségrégées en domaines est la somme de l'énergie de courbure de la bicouche et de l'énergie de ligne due aux bords des domaines. L'énergie de ligne diminue si les domaines 'bourgeonnent' hors du plan de la membrane alors que l'énergie de courbure diminue si les domaines sont plans. C'est la compétition entre énergie de courbure et énergie de ligne qui va

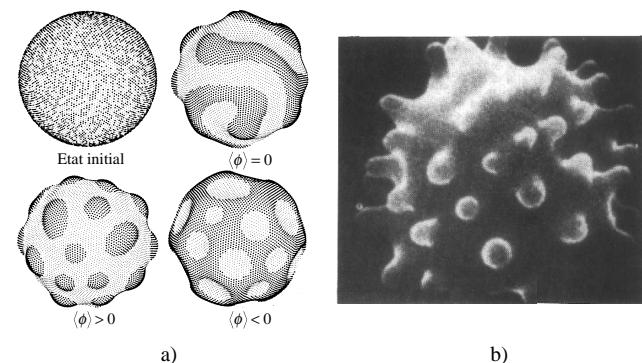


FIG. I.3.8: Morphologies crénélées. a) Simulations numériques pour une membrane à deux composants : évolution à partir de l'état initial pour les cas $\langle \phi \rangle = 0$, $\langle \phi \rangle > 0$, et $\langle \phi \rangle < \langle \phi \rangle$, où ϕ est la différence de concentration locale. Les points noirs représentent les sites où $\phi < \langle \phi \rangle$ (d'après [Taniguchi, 1996]). b) Globule rouge sous sa forme crénelée obtenue après le phénomène d'érythrocytose (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

déterminer la forme de la membrane [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 436].

La description théorique s'appuie encore une fois sur le modèle de courbure décrit au paragraphe §I.1.2 auquel est ajouté le terme d'énergie libre de Ginzburg-Landau suivant en notation covariante :

$$\mathcal{H}_\phi = \int_A \left[\frac{\sigma_0}{2} (\nabla \phi)^2 + \frac{\sigma_2}{2} \phi^2 + \frac{\sigma_4}{4} \phi^4 \right] \sqrt{g} d^2 u,$$

où ϕ est la différence de composition locale de la membrane. En fonction du nombre et de la taille des domaines présents dans la membrane, plusieurs scénarios ont été prévus théoriquement et numériquement. Dans le cas d'une séparation de phase complète pour une vésicule à deux composants, seuls deux domaines coexistent : si la taille de chaque domaine est suffisamment grande, alors un phénomène de 'bourgeonnement' (*domain-induced budding*) se produit et scinde la vésicule en deux vésicules plus petites reliées par un 'col' (*neck*), contenant chacune uniquement un des deux types lipidiques [Jülicher and Lipowsky, 1993, Jülicher and Lipowsky, 1996]. Le phénomène de fission des deux vésicules a été analysé à l'aide du terme de courbure gaussienne du modèle de courbure [Jülicher and Lipowsky, 1993, Chen et al., 1997]. Si de nombreux domaines coexistent, on s'attend à ce que les domaines forment des protrusions (*buds*) plus ou moins circulaires à la surface de la vésicule [Harden and MacKintosh, 1994]. Des simulations numériques ont en effet montré l'existence de ces protrusions sur des membranes planes [Kumar and Rao, 1998] ainsi que sur des vésicules [Taniguchi, 1996] donnant naissance à une morphologie de vésicules 'crénélées' similaire à celle observée lors de l'érythrocytose des globules rouges (voir Figs. I.3.8 et I.3.18).

La région du diagramme de phase où les deux lipides sont miscibles à température élevée est, elle aussi, intéressante. Si, par exemple, les deux lipides sont de formes géométriques différentes, les inhomogénéités de composition latérale ou l'asymétrie entre les deux monocouches crée une courbure spontanée locale [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 279, p. 436]. Un couplage entre la courbure et la composition de la membrane apparaît. Si la vésicule change de forme pour une raison quelconque (voir §I.3.1.3), ce couplage peut alors provoquer une séparation de phase (*curvature-induced phase segregation*) [Leibler and Andelman, 1987, Seifert, 1993]. Des expériences sur des vésicules géantes mixtes (SPM ou DMPC/cholestérol) ont mis en évidence qu'un changement de température ou de pression osmotique entraînant une diminution du volume adimensionné $v = V/\frac{4}{3}\pi R^3$ induit une transition de ‘bourgeonnement’ [Döbereiner et al., 1993] (voir Fig. I.3.9). La redistribution asymétrique des lipides entre les deux feuillets de la bicouche provoque elle aussi des changements de morphologie observés expérimentalement [Farge and Devaux, 1992] : ‘bourgeonnement’, formation de tubules ou de vésicules connectées... De la même façon, si les charges de deux feuillets sont différentes, les forces électrostatiques doivent courber la membrane et aboutir à la formation de tubules [Chou et al., 1997]. Des séparations latérales de phase peuvent aussi être provoquées si la membrane contient des lipides neutres et chargés, par exemple par variation du pH ou de la force ionique [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 249]. Enfin, dans le cas où deux membranes mixtes constituées d'un mélange de lipides neutres et chargés interagissent, une séparation de phase induite par les interactions électrostatiques entre bicouches a été prévue théoriquement [Gelbart and Bruinsma, 1997].

Même si le modèle de vésicules à deux composants reste très simple en comparaison avec les mélanges lipidiques d'une membrane biologique, il permet de rendre compte, par des mécanismes purement physiques, de phénomènes très proches de ceux observés dans la cellule [Döbereiner et al., 1993]. Le ‘bourgeonnement’, les phénomènes d’endocytose, d’exocytose et plus généralement de fusion membranaire sont essentiels pour le transport de matière à l’intérieur de la cellule et pour les échanges avec l’extérieur (voir §I.2.3.2). L’existence de microdomaines intramembranaires semble aussi jouer un rôle fondamental dans la signalisation et le transfert d’information dans la cellule (voir §§I.2.2 et I.2.3.3).

I.3.2.2 Inclusions et protéines membranaires

Le terme d’‘inclusion membranaire’ est assez général et désigne diverses situations expérimentales ayant toutes en commun l’interaction entre une membrane lipidique et une molécule (peptide, protéine, polymère, macroion) ou une particule (colloïde, sphère dure) [Netz, 1997]. Cette interaction se traduit par une déformation locale de la membrane qui a des conséquences tant au niveau microscopique qu’au niveau de la forme macroscopique de la membrane. Pour simplifier la présentation, nous distinguerons deux cas différents : ou bien la molécule ou la particule se trouve hors de la membrane, en contact ou à proximité de la membrane (voir Fig. I.3.10) ; ou bien elle est enfouie dans la bicouche (voir Fig. I.3.13). Nous détaillerons ensuite le

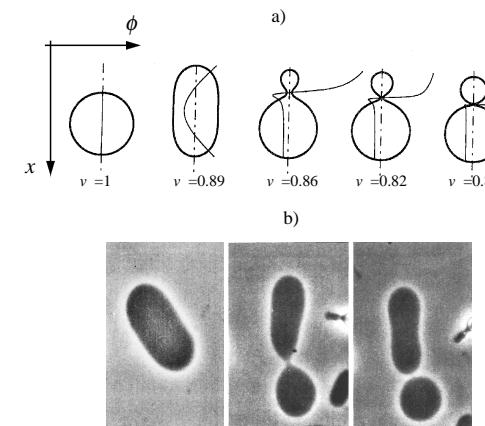


FIG. I.3.9: ‘Bourgeonnement’ induit par séparation de phase dans des vésicules à deux composants. a) Simulations numériques pour des valeurs décroissantes du volume adimensionné $v = V/\frac{4}{3}\pi R^3$ (d’après [Seifert, 1993]). La ligne fine représente les variations de la différence de concentration locale ϕ le long de l’axe de la vésicule. b) Transition de ‘bourgeonnement’ d’une vésicule de DMPC:Chol (60 : 40) induite par un changement de pression osmotique et observée en contraste de phase (d’après [Döbereiner et al., 1993]).

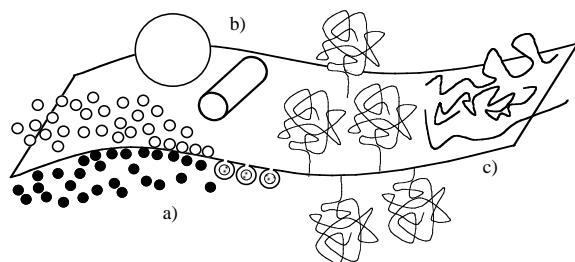


FIG. I.3.10: Exemples d'inclusions en contact avec la bicouche. a) Colloïdes : deux types de colloïdes différents adhérents ou non à la membrane. b) Objets macroscopiques en contact avec la membrane : billes et cylindres. c) Polymères greffés ou adsorbés sur la membrane.

cas particulier des protéines membranaires.

Molécules et particules en contact avec une bicouche

La morphologie d'une vésicule est contrôlée par les différents paramètres élastiques qui interviennent dans le modèle de courbure et ses variantes, comme le modèle ADE (voir §I.3.1.3). La courbure spontanée de la bicouche est modifiée par la présence de molécules et de particules au voisinage de la membrane. Si les interactions entre la membrane et les particules sont attractives alors les particules vont s'adsorber sur la membrane. Dans le cas de suspensions colloidales, les interactions de volume exclu seront prédominantes. Dans le cas de particules chargées, les interactions électrostatiques devront être prises en compte.

Différents cas ont été examinés théoriquement. Pour des vésicules en présence de deux espèces de nanoparticules ou de colloïdes, la courbure de la membrane est modifiée en fonction de la taille des particules et du type d'interactions [Lipowsky and Döbereiner, 1998, Lipowsky et al., 1998] : de grosses particules adhésives peuvent même s'encapsuler dans la bicouche. Une courbure spontanée positive ou négative de la membrane peut aussi être induite en présence de polymères [Hiergeist et al., 1996, Lipowsky et al., 1998, Kohyama, 1998]. Là encore le signe de la courbure dépend du type d'interactions : chaîne en régime dilué libre, ancrée ou adsorbée sur la membrane, brosse de polymères ou champignons présents sur un côté ou sur les deux côtés de la membrane... Des modifications des propriétés élastiques (par exemple une augmentation du module de courbure κ) dues aux interactions entre la membrane et les polymères, sont aussi prévues théoriquement : dans le régime champignon, l'augmentation de κ est faible, de l'ordre de $0.1 kT$, alors qu'en régime brosse semi-diluée, κ devrait augmenter d'au moins un ordre de grandeur [Wang and Safran, 1991, Sung and Oh, 1996, Hiergeist and Lipowsky, 1996]. Enfin, une membrane chargée peut être déformée par les forces électrostatiques dues à l'adsorption de macroions [Schiessel, 1998] ou par les forces magnétiques créées par l'action d'un champ

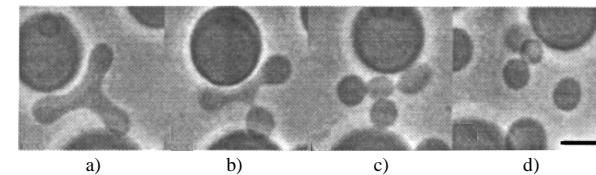


FIG. I.3.11: 'Bourgeonnement' d'une vésicule en étoile de mer (au centre, entourée par d'autres vésicules) induit par l'addition d'une solution de polymère (Cholesteryl-Polyethyleneglycol 0.1 mM). a) à c) Phase de 'bourgeonnement' d'une durée totale d'environ 10 s. d) Les sphères restent reliées entre elles par des filaments lipidiques. La barre représente 5 μm . (d'après [Döbereiner et al., 1997b]).

magnétique statique ou tournant sur particules ferromagnétiques adsorbées sur la membrane [Kern and Fourcade, 1997].

La courbure spontanée peut être mesurée expérimentalement par l'observation en microscopie optique des changements de forme d'une vésicule [Döbereiner et al., 1997a] (voir §I.3.1.3). Cette technique a permis d'observer par exemple une transition de 'bourgeonnement' ainsi qu'une augmentation de la courbure spontanée en présence d'une asymétrie de composition en sucres entre l'intérieur et l'extérieur d'une vésicule [Döbereiner et al., 1999]. Divers changements de morphologies sont obtenus par addition de polymères et peuvent être interprétés comme une augmentation de courbure spontanée [Döbereiner et al., 1997b] : 'bourgeonnement', transition stomatocyte-discocyte, rupture des bras d'une vésicule en 'étoile de mer'... Quelques exemples sont donnés à la figure I.3.11. Les propriétés élastiques de vésicules à la surface desquelles ont été greffées des chaînes de polymères (PEG pour *PolyEthylene Glycol*) à des densités variables ont été étudiées par aspiration dans une micropipette (voir §I.3.1.5) [Evans and Rawicz, 1997] : le module de courbure augmente de près de $10 kT$, indiquant l'existence d'un régime intermédiaire entre le régime champignon et la brosse semi-diluée.

Des expériences ont été effectuées à l'aide de billes de verre ou de latex plus grosses (plusieurs microns de diamètre), qui présentent l'avantage de pouvoir être micromanipulées. L'étude du mouvement de ces billes à la surface de vésicules unilamellaires a permis de déterminer la viscosité de membrane (voir §I.1.3.3) de l'ordre de $\eta_{mb} \simeq 3 \times 10^{-6}$ surface poise [Velikov et al., 1997]. Le phénomène d'adhérence et d'"internalisation" des billes à l'intérieur de la vésicule a été analysé en terme de mouillage de la bille par la membrane [Dietrich et al., 1997].

Les différents exemples cités ci-dessus mettent en jeu l'interaction entre des particules ou des molécules et une membrane simple constituée d'un seul type de lipides. Des systèmes plus complexes où la membrane est formée d'un mélange de lipides ont aussi été étudiés (voir ci-dessus §I.3.2.1). Par exemple, l'adsorption de polypeptides chargés, comme la polylysine chargée positivement, à la surface de bicouches formées d'un mélange de lipides neutres (DMPC) et

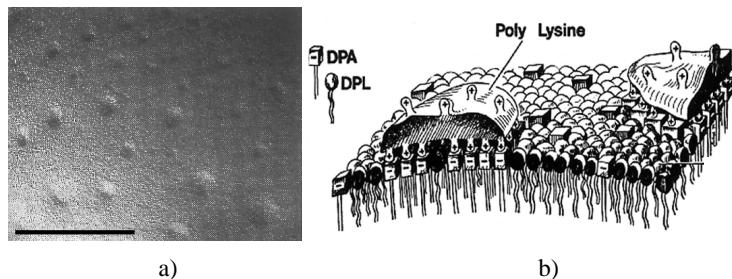


FIG. I.3.12: Formation de domaines dans des vésicules mixtes de DMPA et DMPC induite par l'adsorption de polylysine. a) Image de la membrane en microscopie électronique (la barre représente $0.5\mu\text{m}$). b) Schéma montrant les interactions électrostatiques entre la polylysine, chargée positivement, et les lipides DMPA chargés négativement (d'après [Sackmann, 1994]).

de lipides chargés négativement (DMPA) peut induire une séparation de phase et aboutir à la formation de domaines (voir Fig. I.3.12) [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 279].

Molécules et particules incorporées dans une bicouche

Nous allons maintenant examiner le cas où l'inclusion traverse la bicouche lipidique. La membrane apparaît alors comme un solvant apolaire dans lequel peuvent s'incorporer et diffuser des molécules ou particules hydrophobes. Ces inclusions jouent le rôle de défauts dans la bicouche lipidique et perturbent localement les propriétés structurales et élastiques de la membrane.

Sur le plan théorique, l'incorporation d'inclusions dans la membrane qui interagissent de façon anisotrope avec la membrane entraîne un couplage entre la courbure de la membrane et la densité des inclusions. Les cas les plus classiques sont ceux d'inclusions asymétriques ou d'inclusions ne traversant qu'une seule des deux bicouches (voir Fig. I.3.13). On ajoute alors au hamiltonien de courbure \mathcal{H} (Eq. I.1.3) un terme de couplage entre la courbure locale c de la membrane et la densité locale ϕ d'inclusions et un terme d'interaction entre les inclusions [Leibler, 1986] :

$$\mathcal{H}_\phi = \int_A \left[-\Lambda \phi c + \frac{\sigma_0}{2} (\nabla \phi)^2 + f[\phi] \right] d^2 \mathbf{r},$$

où Λ est la constante de couplage entre la courbure locale et la densité d'inclusions et $f[\phi]$ est une fonctionnelle pouvant être développée en puissances de ϕ . À l'ordre le plus bas, $f[\phi] = (\sigma_1/2)\phi^2$. Dans ce cas, la présence des inclusions diminue le module de courbure κ de la membrane et peut même destabiliser la membrane par une instabilité appelée 'instabilité de courbure' (*curvature instability*) [Leibler, 1986]. Dans le cas où les inclusions ne sont pas de forme symétrique, l'orientation de l'inclusion est couplée à la courbure. On trouve de nouveau une diminution du module de courbure et une instabilité de la morphologie de la membrane [Fournier, 1996]. Ces instabilités

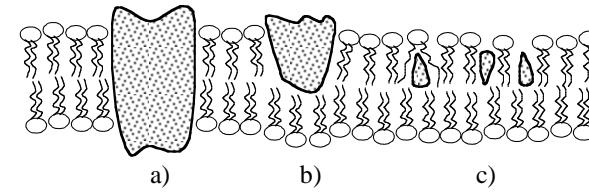


FIG. I.3.13: Exemples d'inclusions incorporées dans la bicouche. a) L'inclusion traverse la membrane. b) L'inclusion est située dans une seule des deux monocouches. c) L'inclusion s'intercale entre les molécules de lipides ou entre les chaînes hydrocarbonées.

de courbure pourraient fournir une explication purement physique au phénomène d'échinocytose des globules rouges (voir Fig. I.3.8 et §I.3.2.1).

Un autre aspect intéressant traité théoriquement est celui des interactions entre les inclusions. Aux interactions directes, le plus souvent à courte portée, s'ajoutent des interactions transmises par la membrane [Goulian et al., 1993]. Les interactions entre deux inclusions sont répulsives s'il y a couplage avec la courbure [Netz, 1997, Dommersnes et al., 1998, Kim et al., 1998]. Les interactions à N inclusions font apparaître des effets non triviaux [Netz, 1997, Kim et al., 1998, Kim et al., 1999] : elles peuvent être attractives et donner naissance à des agrégats d'inclusions.

L'intérêt principal de ces considérations théoriques tient surtout à leur application au cas des protéines membranaires (voir ci-dessous). Sur le plan expérimental, les études sont peu nombreuses car l'incorporation de molécules ou de particules dans une bicouche lipidique n'est pas facile à réaliser : la concentration des inclusions est souvent faible et difficile à contrôler. L'incorporation de peptides dans des vésicules géantes a montré qu'il existe bien un effet des inclusions sur les propriétés élastiques de la membrane. Le module de compressibilité χ défini au paragraphe §I.1.2.1 diminue avec l'introduction de petits peptides de 16 ou 24 acides aminés de façon plus ou moins importante en fonction de la température et de la présence ou non de cholestérol [Evans and Needham, 1987]. Le module de courbure κ diminue lui aussi légèrement lorsque la gramicidine, un canal formé de l'assemblage dans la bicouche de deux monomères, est incorporée dans la membrane de vésicules géantes de SOPC [Méléard et al., 1998]. D'autres études ont montré que la tension de la membrane influence la cinétique de dimérisation de la gramicidine [Huang, 1986, Goulian et al., 1998].

Cas particulier des protéines membranaires

Le cas le plus intéressant en vue d'un modèle complet de membrane biologique est celui où les inclusions sont des protéines. Une protéine n'est pas une simple inclusion comme dans le paragraphe précédent puisqu'elle possède une fonction biologique : elle doit donc pouvoir rester fonctionnelle après son incorporation dans la bicouche. Lorsqu'une protéine est incorporée

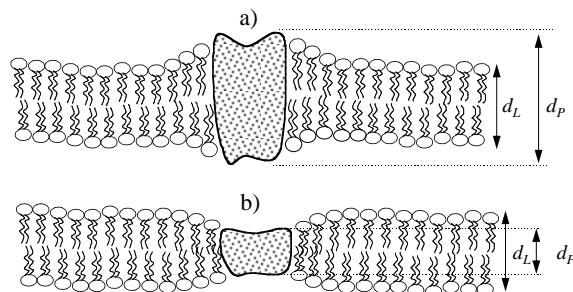


FIG. I.3.14: Illustration schématique du décalage hydrophobe. La longueur du domaine transmembranaire et celle des chaînes lipidiques sont notées respectivement d_P et d_L . a) Cas où $d_P > d_L$. b) Cas où $d_P < d_L$.

dans une bicouche, son domaine transmembranaire interagit directement avec l'environnement lipidique via des interactions hydrophobes et électrostatiques. La partie extramembranaire joue un rôle moins important, sauf si elle peut s'adsorber à la surface de la bicouche ou relier la protéine à un réseau polymérisé (voir §I.3.3).

Considérons pour commencer une membrane constituée d'un seul type de lipides. Pour une bonne incorporation de la protéine, la longueur du domaine transmembranaire d_P de la protéine doit correspondre à celle des chaînes hydrophobes des lipides voisins d_L pour minimiser le contact avec le solvant aquieux [Huang, 1986], [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 388]. Si $d_P > d_L$, les chaînes lipidiques doivent s'étirer, si au contraire $d_P < d_L$, elles doivent se comprimer. La différence $d_P - d_L$, appelée 'décalage hydrophobe' (*hydrophobic mismatch*, voir Fig. I.3.14), caractérise les interactions lipides-protéines et est utilisé comme paramètre d'ordre dans la plupart des modèles théoriques et numériques [Bloom et al., 1991, Sperotto and Mouritsen, 1991, Fattal and Ben-Shaul, 1993, Mouritsen and Bloom, 1993].

La présence d'une protéine perturbe localement les chaînes lipidiques [Sperotto and Mouritsen, 1991]. Par exemple, la reconstitution de la bactériorhodopsine (voir partie expérimentale) dans des LUVs de DMPC a permis de mettre en évidence une augmentation du paramètre d'ordre des lipides lorsque la concentration de protéines augmente [Heyn et al., 1981]. Si deux protéines sont suffisamment proches, ces perturbations des lipides peuvent donner lieu à des forces entropiques à courte portée entre protéines, différentes des forces à longue portée entre inclusions discutées au paragraphe précédent. De telles forces attractives entre protéines médiées par les lipides ont été observées numériquement [Sintes and Baumgärtner, 1998]. S'il est clair qu'une protéine modifie localement l'environnement lipidique, réciproquement, on peut aussi s'attendre à un effet des lipides sur le fonctionnement des protéines membranaires : une déformation mécanique macroscopique de la membrane pourrait donc affecter la fonction d'une protéine via des interactions lipides-

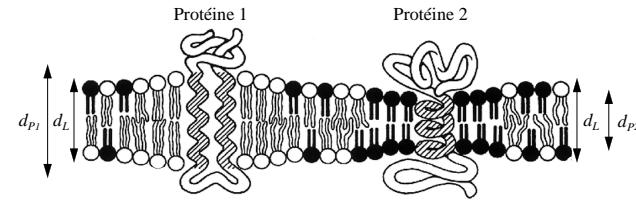


FIG. I.3.15: Représentation schématique de la sélection locale des lipides adaptés à la taille de la protéine. Les lipides à longue chaîne hydrocarbonnée (en blanc) entourent préférentiellement la protéine 1 à long domaine transmembranaire, alors que les lipides courts (en noir) s'accumulent à proximité de la protéine 2 de domaine transmembranaire plus petit (d'après [Sackmann, 1994]).

protéines. La mise sous tension de la membrane pourrait par exemple diminuer suffisamment l'épaisseur de la bicouche au voisinage des protéines pour modifier le 'décalage hydrophobe' [Cantor, 1997, Goulian et al., 1998]. Si la température est abaissée sous la température de transition des lipides, les interactions lipides-protéines sont fortement perturbées et des agrégats de protéines peuvent se former, comme c'est le cas pour la bactériorhodopsine [Cherry et al., 1978, Heyn et al., 1981]. Des mesures du changement de la température de transition de phase T_{trans} , due à la présence de bactériorhodopsine [Piknova et al., 1993] ou de centre réactionnel photosynthétique [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 289], en fonction de la longueur de chaîne des lipides ont été effectuées par des techniques de fluorescence ou de calorimétrie différentielle. Ces études ont montré que ΔT_{trans} est minimale pour les lipides dont la longueur de chaîne minimise le 'décalage hydrophobe'. Cela montre que la présence de protéines perturbe moins une membrane si le 'décalage hydrophobe' est minimal. Réciproquement, pour des lipides dont la taille de la chaîne carbonée est adaptée à celle du domaine transmembranaire de la protéine, l'incorporation des protéines sera facilitée et leur fonctionnement ne sera pas affecté.

Le cas des membranes mixtes formées d'inclusions de protéines dans un mélange de plusieurs lipides donne lieu à des comportements encore plus complexes. La minimisation du 'décalage hydrophobe' impose que la protéine s'entoure des lipides dont la longueur de chaîne est la plus adaptée à la longueur de son domaine hydrophobe (voir Fig. I.3.15). Un mécanisme de sélection locale des lipides proches de la protéine doit donc se produire. Ce mécanisme (*molecular sorting* ou *molecular selectivity*) a été simulé numériquement dans des systèmes ternaires lipide-lipide-protéine [Sperotto and Mouritsen, 1993] et a été mis en évidence expérimentalement dans des vésicules mixtes LUVs composées de bactériorhodopsine incorporée dans un mélange DLPC/DSPC [Dumas et al., 1997]. L'addition de cholestérol dans des vésicules de DMPC contenant de la bactériorhodopsine induit aussi une agrégation de la protéine [Cherry et al., 1980]. Enfin, comme dans le cas classique des monocouches, l'incorporation de protéines dans des bicouches modifie les diagrammes de phase de membranes à deux composants lipidiques. Des expériences de

FRAP ont montré que la présence de bactériorhodopsine dans des bicouches de DMPC/DSPC change la taille des domaines ordonnés [Schram and Thompson, 1997]. La distribution de la bactériorhodopsine dans les différents domaines en coexistence semble dépendre du type de lipides constituant la membrane [Schram and Thompson, 1997, Dumas et al., 1997].

Nous ne nous sommes intéressés ici qu'au rôle du 'décalage hydrophobe' dans les interactions lipides-protéines ou protéines-protéines. D'autres forces interviennent et sont loin d'être négligeables : liaisons hydrogène, interactions électrostatiques entre charges des protéines et des lipides, forces de van der Waals... La description complète du comportement de protéines dans une membrane biologique est donc bien plus complexe que celle des modèles simples présentés ci-dessus.

I.3.3 Membranes polymérisées ou interagissant avec des polymères biologiques

La bicouche lipidique d'une membrane biologique est en général couplée à un réseau de polymères appelé cytosquelette. La composition et la morphologie du cytosquelette des cellules biologiques sont complexes et variées. Il peut prendre la forme d'un réseau bidimensionnel très organisé ou celle d'un cortex plus désordonné (voir §§I.2.1.1 et I.2.3.3). Le cytosquelette joue un rôle structurel en rigidifiant la membrane de la cellule, mais il intervient aussi dans les processus dynamiques de locomotion et d'adhérence, au cours de la division cellulaire, ou encore dans le trafic vésiculaire... Les développements de la physique des polymères ont permis d'envisager des modèles d'interactions entre une membrane et des polymères dans le but d'une description physique du cytosquelette cellulaire. Les nombreuses études sur le globule rouge sont motivées par le fait que cette cellule constitue un exemple biologique simple de membrane fluctuante et polymérisée.

I.3.3.1 Interactions entre une membrane et des polymères biologiques

Nous avons évoqué les effets de polymères flexibles en solution au voisinage d'une membrane ou adsorbés sur la membrane, au paragraphe précédent §I.3.2.2. Nous allons nous intéresser ici aux déformations que peuvent provoquer des polymères biologiques plus rigides, comme les microtubules ou les filaments d'actine, sur la morphologie d'une membrane lipidique.

La tubuline est un des constituants protéiques majeurs du cytosquelette des cellules biologiques. A température suffisamment élevée et en présence de GTP, les molécules de tubuline s'assemblent pour former de longs filaments fins et très rigides, de longueur de persistance de l'ordre du millimètre, appelés microtubules. Les microtubules ont un rôle biologique important et interviennent par exemple lors de la division cellulaire et lors du transport de vésicules endosomiales. Il est possible de former des microtubules dans des vésicules lipidiques géantes

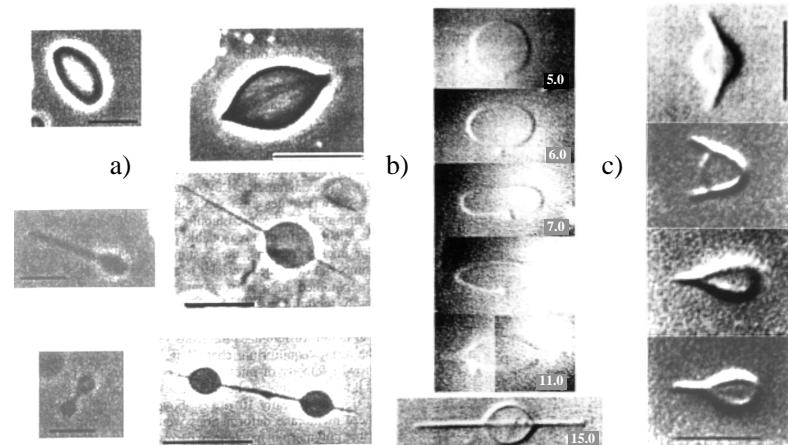


FIG. I.3.16: Images en microscopie à contraste de phase de vésicules lipidiques dans lesquelles ont été polymérisés des microtubules. a) Différentes morphologies obtenues : ovale, citron, cerise ou demi- ϕ , forme ϕ , haltères et perles. Les barres représentent $10\text{ }\mu\text{m}$ (d'après [Emsellem et al., 1998]). b) Formation de la forme ϕ par assemblage d'un faisceau de 1 à 3 microtubules. Le chiffre indique la taille du grand axe en μm . La vitesse de croissance des microtubules est de l'ordre de $2\text{ }\mu\text{m}/\text{min}$ (d'après [Fygenson et al., 1997b]). c) Instabilité de flambage de microtubules dans une vésicule de forme ϕ . La barre représente $5\text{ }\mu\text{m}$ (d'après [Fygenson et al., 1997b]).

[Hotani and Miyamoto, 1990, Elbaum et al., 1996]. En général, plusieurs microtubules s'associent et grandissent ensemble en formant un ‘faisceau’ (*bundle*) de microtubules parallèles dans la vésicule. Lorsque la longueur L du microtubule devient plus grande que le diamètre $2R_{ves}$ de la vésicule, le microtubule exerce une force sur la membrane qui met la membrane sous tension et la déforme élastiquement. Différentes morphologies d'équilibre sont obtenues expérimentalement : ellipsoïde ou ovale, prolate pointu ou ‘citron’, forme ‘ ϕ ’ par analogie avec la lettre grecque, ‘demi- ϕ ’ ou ‘cerise’, ‘haltères’ et ‘perles’ [Fygenson et al., 1997b, Emsellem et al., 1998]. Ces morphologies peuvent être prévues numériquement par minimisation de l'énergie de courbure de la membrane \mathcal{H} et classées dans un diagramme de phases paramétré par exemple par S/R_{ves}^2 et R_{ves}/L , où S est la surface de la vésicule déformée [Emsellem et al., 1998, Umeda et al., 1998]. La forme ‘ ϕ ’ est particulièrement intéressante car elle rappelle la morphologie de cellules dont l'actine (voir ci-dessous) a été dépolymérisée [Bailly et al., 1991]. De plus, la forme ‘ ϕ ’ présente une instabilité de ‘flambage’ (*buckling instability*) spontanée aboutissant à une forme en ‘demi- ϕ ’ dans laquelle les deux extrémités du faisceau de microtubules se sont rejoindes. Cette instabilité peut aussi être provoquée en augmentant la tension de la membrane à partir de la forme ‘ ϕ ’. Dans des expériences où la tension est contrôlée par aspiration dans une micropipette, le faisceau de microtubules flambe pour former un anneau à la périphérie de la vésicule [Elbaum et al., 1996, Fygenson et al., 1997a]. La figure I.3.16 donne des exemples de formes d'équilibre citées ci-dessus, ainsi que de la formation de la forme ‘ ϕ ’ et de son instabilité de flambage.

L'actine est un autre exemple de polymère qui constitue le cytosquelette d'une cellule biologique. Les monomères d'actine (actine G globulaire) s'assemblent en présence d'ions Mg^{2+} pour former des filaments hélicoïdaux d'actine (actine F filamentaire) semi-flexibles, de longueur de persistance de l'ordre de $10\ \mu m$. Comme précédemment, on peut former des filaments d'actine à l'intérieur de vésicules géantes [Miyata and Hotani, 1992, Häckl et al., 1998]. Les vésicules initialement quasi-sphériques et fluctuantes sont mises sous tension et déformées lorsque les filaments grandissent. La longueur de persistance de l'actine étant plus petite que celle des microtubules, les déformations obtenues, par exemple des protrusions coniques et tubulaires (voir Fig. I.3.17a), sont moins spectaculaires, mais ressemblent beaucoup aux déformations de membranes cellulaires [Häckl et al., 1998]. Des formes analogues au ‘ ϕ ’ sont observées pour des concentrations d'actine élevées [Miyata and Hotani, 1992]. On retrouve une instabilité de flambage (*buckling instability*) similaire à celle rencontrée pour les microtubules : les filaments d'actine se bouclent pour former une coque ou ‘cortex’ d'actine d'environ $1\ \mu m$ d'épaisseur contre la membrane (voir Fig. I.3.17b). Les fluctuations thermiques de la membrane semblent empêcher tout couplage entre ce cortex d'actine et la membrane [Häckl et al., 1998].

I.3.3.2 Membranes polymérisées, exemple du globule rouge

On distingue formellement deux types de membranes polymérisées : soit un réseau de polymères se trouve ancré à la surface de la bicouche, soit la bicouche elle-même est polymérisée dans

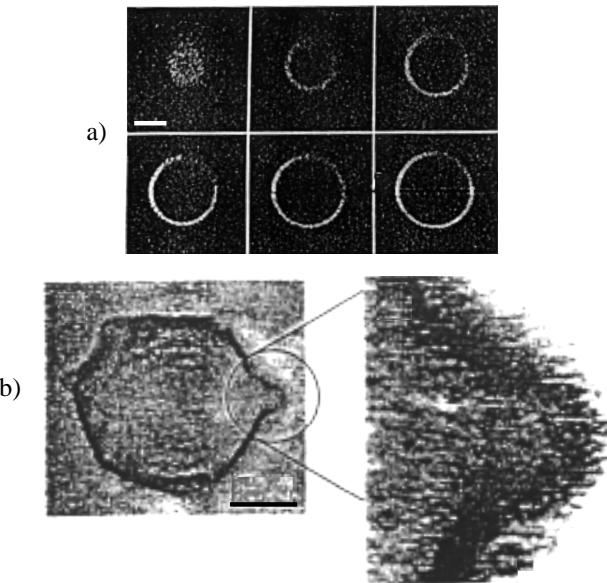


FIG. I.3.17: Filaments d'actine polymérisés dans des vésicules lipidiques. a) Image de microscopie confocale montrant l'accumulation d'actine marquée à la rhodamine contre la membrane de la vésicule. La séquence totale dure environ 2 heures. La barre représente $15\ \mu m$. b) Protrusions observées en contraste de phase lors de la polymérisation. La barre représente $5\ \mu m$ (d'après [Häckl et al., 1998]).

son volume, par exemple par l'intermédiaire de chaînes lipidiques polymérisables. Les membranes biologiques font partie de la première catégorie de membranes polymérisées, puisqu'elles sont en général couplées à un cytosquelette par l'intermédiaire de protéines transmembranaires.

Aspects théoriques et expérimentaux des membranes polymérisées

Dans les modèles ‘macroscopiques’ comme le modèle de courbure, on ne fait pas la distinction entre les membranes polymérisées à la surface ou dans le volume de la bicoche. La caractéristique principale d'une membrane polymérisée est de posséder une énergie de cisaillement non négligeable, contrairement à une membrane fluide. L'énergie de cisaillement H_{cis} faisant intervenir le module de cisaillement μ (voir §I.1.2.1) doit donc être prise en compte dans l'énergie élastique de la membrane. Pour une membrane plane, incompressible et fluctuante, les déplacements verticaux produisent un cisaillement transverse (voir par exemple [Nelson and Peliti, 1987, Peterson et al., 1992]). On doit donc aussi considérer les déformations de la membrane dans le plan de la membrane, notées respectivement $v_1(x, y)$ et $v_2(x, y)$. Comme pour le terme de courbure et le terme de tension dans l'expression de \mathcal{H} (voir Eq. I.1.3, §I.1.2.2), le terme d'énergie de cisaillement d'une membrane polymérisée s'exprime en fonction de la fluctuation de forme de la membrane $\mathbf{u}(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = (\mathbf{v}_1(\mathbf{x}, \mathbf{y}), \mathbf{v}_2(\mathbf{x}, \mathbf{y}), \mathbf{u}(\mathbf{x}, \mathbf{y}))$ [Landau and Lifchitz, 1990b, Peterson, 1985a] :

$$\mathcal{H}_{cis} \simeq \int \int_A \mu \left(\frac{1}{2} (v_{11} - v_{22})^2 + 2v_{12}^2 \right) dS, \quad (\text{I.3.2})$$

où $v_{ij} = 1/2(\partial_j v_i + \partial_i v_j + \partial_i u \partial_j u)$ est le tenseur des déformations. On en déduit le spectre de fluctuations d'une membrane polymérisée [Lipowsky and Girardet, 1990] :

$$\langle u(q_-)^2 \rangle \simeq \frac{kT}{\kappa q_-^4 + c' \sqrt{kT\mu} q_-^3 + \sigma q_-^2}, \quad (\text{I.3.3})$$

où $c' \simeq 2.6$ est une constante numérique. Pour une membrane sans tension, on s'attend à observer deux régimes de fluctuations : aux petits vecteurs d'onde, $q_- \ll c' \sqrt{kT\mu}/\kappa$, le cisaillement domine et le spectre se comporte comme $1/q^3$; aux grands vecteurs d'onde, $q_- \gg c' \sqrt{kT\mu}/\kappa$, la courbure domine et le spectre se comporte comme $1/q^4$.

Les transitions de phase d'une membrane polymérisée ont été beaucoup étudiées aussi bien théoriquement que numériquement. Une transition de froissement d'une phase aplatie (*flat phase*) à basse température vers une phase froissée (*crumpled phase*) à haute température a été prévue théoriquement [Nelson and Peliti, 1987, Kardar and Nelson, 1987, Benyoussef et al., 1998], mais n'a jamais pu être observée numériquement [Drovetzky et al., 1998]. Les résultats expérimentaux sont eux aussi contradictoires : dans certaines conditions expérimentales, l'existence d'une transition de phase est confirmée [Mutz et al., 1991, Liu and Plischke, 1992], alors que dans d'autres expériences, aucune transition n'a pu être mise en évidence [Schmidt et al., 1993, Spector et al., 1994, Hotz and Meier, 1998]. La question reste donc ouverte.

Contrairement aux modèles ‘macroscopiques’, les descriptions plus microscopiques de la membrane peuvent traiter spécifiquement le cas où la bicoche lipidique est polymérisée dans son

volume. Le modèle de ‘pointes’, par exemple, prévoit une ségrégation du polymère dans l'une ou l'autre des monocouches [Helfrich and Kozlov, 1994]. Ce mécanisme pourrait expliquer l'observation expérimentale de vésicules géantes partiellement polymérisées bourgeonnant à la fois vers l'intérieur et vers l'extérieur de la vésicule [Simon et al., 1995]. La géométrie sphérique des vésicules géantes peut aussi être conservée lors de la polymérisation et on peut même obtenir, après solubilisation de la membrane, des sphères de polymères creuses [Hotz and Meier, 1998]. Enfin, la polymérisation de styrène à l'intérieur de la bicoche de LUVs entraîne à une séparation de phase et une ségrégation du polymère dans des petites sphères reliées à la vésicule ayant la forme de ‘parachutes’ [Jung et al., 1997, Morgan et al., 1997].

On peut réaliser des membranes où le réseau polymérisé se trouve à l'extérieur de la bicoche, par exemple en utilisant des lipides dont la tête polaire porte un groupement polymérisable. Le modèle ADE permet d'expliquer, en terme de changement de courbure spontané, les modifications de morphologie de vésicules mixtes composées de lipides polymérisables par radiation UV [Sackmann et al., 1986]. Nous allons maintenant nous tourner vers un exemple véritablement biologique de membrane polymérisée à sa surface : le globule rouge.

Cas du globule rouge

La membrane des globules rouges (ou érythrocytes) a été décrite au paragraphe §I.2 et constitue un exemple simple de membrane polymérisée (voir Figs. I.2.3, p. 39 et I.2.12, p. 48). Les propriétés mécaniques du globule rouge jouent un rôle particulièrement important lors du passage dans les vaisseaux capillaires et au cours des déformations imposées par le flux sanguin.

Les changements de forme du globule rouge observés expérimentalement sont nombreux (voir par exemple [Elgsaeter et al., 1986, Sackmann et al., 1986]). La forme ‘normale’ du globule rouge est celle d'un disque biconcave, appelée discocyte. Sous l'action de facteurs mécaniques, chimiques ou biologiques, les globules rouges subissent divers changements de forme et peuvent devenir sphériques (sphérocytes), invaginés (stomatocytes), ou encore crénélés (échinocytes) lors de l'échinocytose... La figure I.3.18 illustre les différentes formes que peut prendre un globule rouge. Toutes ces formes d'équilibre sont bien prévues par les modèles de courbure ou ADE en minimisant l'énergie de courbure \mathcal{H} . La forme échinocyte (voir Fig. I.3.8, p. 68) est prévue par des mécanismes purement physiques, par exemple par instabilité de courbure due à la présence d'inclusions dans la membrane [Leibler, 1986] (voir §I.3.2.1) ou par séparation de phase dans des vésicules constituées d'un mélange de deux lipides [Taniguchi, 1996] (voir §I.3.2.2). Il peut paraître surprenant que les prévisions de modèles ne tenant compte que de l'énergie de courbure et négligeant le terme de cisaillement soient si bonnes. La membrane étant polymérisée, on s'attend en effet à ce que l'énergie à minimiser soit $\mathcal{H} + \mathcal{H}_{cis}$ (voir Eq. I.3.2) et pas simplement \mathcal{H} , si le terme de cisaillement et le terme de courbure sont du même ordre de grandeur.

Observé en microscopie à contraste de phase, un globule rouge ‘scintille’. Ce scintillement (*flickering*) est dû aux fluctuations d'épaisseur de la cellule correspondant aux variations d'in-

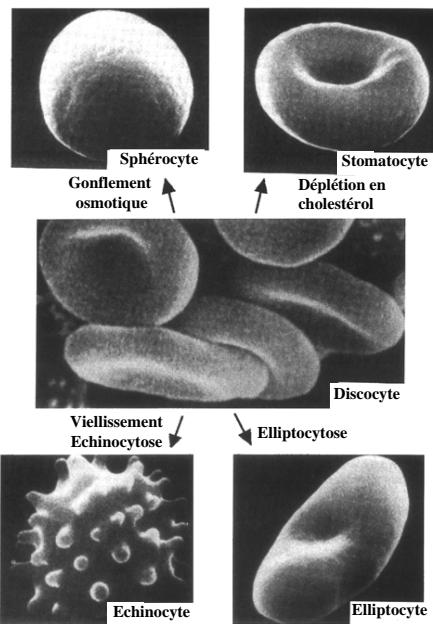


FIG. I.3.18: Images des différentes morphologies du globule rouge en microscopie électronique. La taille d'une cellule est de l'ordre de $10 \mu\text{m}$. Les différents changements de forme sont indiqués par des flèches à partir de la forme discocyte normale du globule rouge (d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a]).

Module de cisaillement μ (10^{-6} J.m^{-2})	Module de courbure κ (10^{-20} J)	Technique expérimentale	Référence
10	-	Flux hydrodynamique	[Hochmuth et al., 1973]
-	5	Fourier (Ph)	[Brochard and Lennon, 1975]
6.6	-	Micropipettes	[Waugh and Evans, 1979]
-	18	Micropipettes	[Evans, 1983]
6	-	Champ électrique	[Engelhardt and Sackmann, 1988]
-	2	Fourier (RICM)	[Zilker et al., 1992]
-	14	Fourier (Ph)	[Peterson, 1992, Peterson et al., 1992]
$0 - 0.16$	$20 - 70$	Fourier (Ph)	[Strey et al., 1995]
2.5 ± 0.4	-	Pince optiques	[Hénon et al., 1999]

TAB. I.3.3: Valeurs expérimentales du module de cisaillement μ et du module de courbure κ du globule rouge obtenues par différentes techniques expérimentales. Abbréviations utilisées : Ph = contraste de phase, RICM = contraste interférentiel par réflexion.

tensité en contraste de phase. La membrane du globule rouge est donc fluctuante et les méthodes décrites au paragraphe §I.3.1.5 peuvent être appliquées pour mesurer le module de courbure κ et le module de cisaillement μ . Les résultats obtenus dépendent de la technique et des hypothèses faites sur le spectre de fluctuations. Si le cisaillement est négligé, on utilise le spectre de fluctuations donné par l'équation I.1.5. Au contraire, si on tient compte du cisaillement, on doit utiliser l'équation I.3.3.

Le module de courbure a été mesuré expérimentalement par les techniques décrites au paragraphe §I.3.1.5 : analyse spectrale du scintillement [Brochard and Lennon, 1975], contraste interférentiel par réflexion RICM [Zilker et al., 1992], décomposition en modes propres [Peterson, 1992, Peterson et al., 1992, Strey et al., 1995], aspiration par une micropipette [Evans, 1983]... Les valeurs obtenues varient selon les techniques : $\kappa \simeq 2 - 70 \times 10^{-20} \text{ J}$, soit $\kappa \simeq 5 - 175 kT$. Le module de cisaillement μ a été déterminé par des expériences de déformations mécaniques : déformation sous flux hydrodynamique, aspiration dans une micropipette, déformation sous champ électrique alternatif ou étirement à l'aide de pinces optiques. Les valeurs obtenues varient entre $\mu = 2.5 \times 10^{-6} \text{ J.m}^{-2}$ et $\mu = 10 \times 10^{-6} \text{ J.m}^{-2}$, la valeur la plus couramment admise étant $6 \times 10^{-6} \text{ J.m}^{-2}$. Des simulations numériques confirment cet ordre de grandeur [Boal, 1994]. Enfin, le module de compressibilité élastique χ a aussi été mesuré. Les valeurs trouvées par des expériences de micropipette sont de l'ordre de $\chi \simeq 10^{-5} \text{ J.m}^{-2}$ [Evans et al., 1976].

Les mesures des modules μ et κ sont récapitulées au tableau I.3.3. On peut en déduire, à partir d'arguments purement physiques plusieurs conclusions concernant les propriétés mécaniques de la membrane du globule rouge. Si, d'un côté, on utilise les ordres de grandeur du module de cisaillement obtenus par déformations mécaniques, on s'aperçoit que le terme de cisaillement domine l'énergie de la membrane et que le phénomène de scintillement devrait être très réduit

par le comportement en $1/q^3$ dans l'équation I.3.3. D'un autre côté, le spectre de fluctuations du globule rouge semble coïncider avec celui d'une membrane fluide non polymérisée. Les formes d'équilibre du globule rouge sont elles aussi prévues par les modèles de courbure sans terme de cisaillement. Ces différentes constatations paraissent contradictoires. Plusieurs explications ont été avancées, la plus simple étant que, lorsque le globule rouge fluctue librement, comme dans le phénomène de scintillement, le cytosquelette est très faiblement couplé à la bicouche lipidique [Sackmann, 1994, Strey et al., 1995]. On peut aussi s'étonner que les valeurs du module de courbure κ trouvées par analyse des fluctuations varient autant d'une technique à l'autre, presque d'un facteur 20 (voir Tab. I.3.3). Une partie de cette variabilité peut s'expliquer par les conditions expérimentales utilisées : milieu, pH, âge des cellules etc... Mais ces différences semblent être aussi dues au fait que les domaines de longueurs d'ondes sondés diffèrent d'une technique à l'autre : les faibles valeurs de κ ($\kappa \simeq 2-5 \times 10^{-20}$ J) sont obtenues par des techniques analysant les courtes longueurs d'onde du spectre [Brochard and Lennon, 1975, Zilker et al., 1992], alors que les valeurs élevées de κ ($\kappa \simeq 14-70 \times 10^{-20}$ J) proviennent de techniques prenant en compte un domaine de longueurs d'onde plus étendu [Evans, 1983, Peterson et al., 1992, Strey et al., 1995]. La taille caractéristique du réseau formé par le cytosquelette est de l'ordre de 80 nm (voir §I.2), donc pour des fluctuations de longueur d'onde inférieure à 80 nm, la présence du cytosquelette ne doit plus se faire sentir et la rigidité de courbure doit donc être proche de celle d'une membrane lipidique fluide. Ces arguments vont bien dans le sens d'une diminution de κ aux courtes longueurs d'onde, même si les techniques d'analyse d'images citées ci-dessus ne permettent pas d'accéder à ce régime de très courtes longueurs d'onde. Enfin, au vu de la composition de la membrane du globule rouge (voir Tab. I.2.2, p. 38), on s'attend, à cause de la présence de cholestérol, à trouver un module de courbure de l'ordre de $\kappa \simeq 40 \times 10^{-20}$ J (voir Tab. I.3.2, p. 65) plus proche des valeurs obtenues par les techniques analysant un domaine de longueurs d'onde étendu. Nous verrons au paragraphe §I.3.4.1 que la faible rigidité de courbure du globule rouge aux courtes longueurs d'onde pourrait traduire l'intervention de phénomènes actifs que nous avons complètement ignorés dans tout ce qui précède.

I.3.4 Prise en compte des phénomènes hors-équilibre

Toutes les études décrites dans les paragraphes précédents ont été effectuées sur des systèmes à l'équilibre thermodynamique - à l'exception des études de vésicules dans un flux hydrodynamique. Les cellules biologiques sont, au contraire, des systèmes hors équilibre, puisqu'elles sont le siège de flux de matière et d'échanges d'énergie. Beaucoup de ces phénomènes hors équilibre ont lieu au niveau de la membrane (voir §I.2) : transport actif d'ions à travers la membrane, action de moteurs moléculaires... Ils mettent en jeu des réactions chimiques irréversibles et une dissipation d'énergie, par exemple stockée sous forme d'ATP. La physique d'un système hors équilibre est différente de celle d'un système à l'équilibre. Un modèle de physique statistique plus complet de membrane biologique doit donc inclure l'aspect hors équilibre de la membrane.

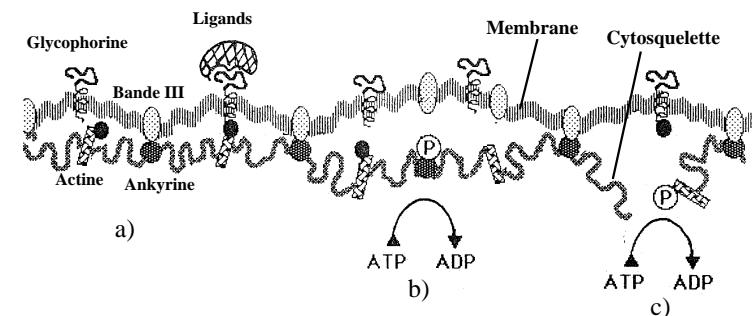


FIG. I.3.19: Régulation du couplage entre la membrane et le cytosquelette du globule rouge par réactions de phosphorylation-déphosphorylation. a) L'addition de ligands peut rigidifier la membrane par un renforcement du couplage avec le cytosquelette. b) et c) La phosphorylation des protéines du cytosquelette affaiblit le couplage et pourrait ainsi augmenter la flexibilité de la membrane (d'après [Sackmann, 1994]).

I.3.4.1 Exemple du globule rouge

L'importance des phénomènes hors équilibre dans la physique des membranes biologiques peut être illustrée par l'exemple du globule rouge. Comme nous l'avons vu auparavant, les formes d'équilibre du globule rouge ainsi que le spectre de fluctuations du scintillement sont bien prévus par des modèles purement physiques, même si l'hypothèse d'un faible couplage entre la bicouche et le cytosquelette doit être faite (voir ci-dessus, §I.3.3.2). Cependant, certains résultats montrent que la morphologie du globule rouge est aussi régulée par voie métabolique. Les changements de formes du globule rouge, notamment lors de l'échinocytose, peuvent être induits par déplétion en ATP [Elgsaeter et al., 1986]. La faible rigidité de courbure de la membrane du globule rouge peut s'expliquer en faisant intervenir des effets actifs [Sackmann, 1994, Strey et al., 1995] : par exemple, la phosphorylation de protéines du cytosquelette comme l'ankyrine ou la glycophorine (voir Fig. I.2.12, p. 48) pourrait induire un découplage transitoire entre la bicouche et le cytosquelette (voir Fig. I.3.19). Dans les conditions 'normales' du scintillement, la grande flexibilité de la membrane semble maintenue par ces réactions de phosphorylation. Ce très faible couplage entre la membrane et le cytosquelette expliquerait aussi pourquoi le terme de cisaillement ne peut pas être mesuré par analyse des fluctuations.

Une série d'expériences, dont l'interprétation n'est cependant pas très claire, a confirmé le rôle de processus actifs dans les fluctuations de forme de la membrane du globule rouge [Levin and Korenstein, 1991, Tuvia et al., 1997]. On a longtemps cru que le phénomène de scintillement ne se produisait que pour des globules rouges de forme biconcave [Brochard and Lennon, 1975]. En effet, après traitement par la saponine, après un choc hypotonique ou après une brusque chute de pH, on obtient des globule rouge 'fantômes' (*ghosts*) de forme

sphérique qui ne fluctuent presque pas. Les fantômes obtenus après traitement à faible pH sont ouverts. Il peuvent être refermés par chauffage de la solution. S'ils sont refermés en l'absence d'ATP, ils restent sphériques et peu fluctuants. En revanche, s'ils sont refermés en présence d'ATP, ils reprennent une forme biconcave et les fluctuations réapparaissent [Levin and Korenstein, 1991]. Cette réapparition des fluctuations n'est pas liée au changement de morphologie, mais à la présence d'ATP. Cela a été montré par des expériences sur les fantômes obtenus après traitement à la saponine qui, eux, ne peuvent pas se refermer : lorsque l'ATP est ajouté, ils restent sphériques tout en redevenant fluctuants [Levin and Korenstein, 1991]. L'effet de la viscosité du milieu externe sur le scintillement a aussi été étudié [Tuvia et al., 1997]. En présence d'ATP, l'amplitude des fluctuations est considérablement réduite par une augmentation de la viscosité, due à l'addition de différents polymères ou macromolécules. En absence d'ATP, l'amplitude des fluctuations est plus faible qu'en présence d'ATP et ne dépend pas de la viscosité du milieu.

L'analyse physique du phénomène de scintillement des globules rouges a toujours été faite en supposant que les fluctuations sont d'origine purement thermique. Les résultats précédents montrent que les fluctuations sont régulées par une voie métabolique liée à la consommation d'ATP, et ne semblent donc pas seulement d'origine thermique. Le fait que l'amplitude des fluctuations dépende de la viscosité pourrait aussi prouver que le bruit possède une composante active hors équilibre. En effet, pour un bruit purement thermique, le théorème fluctuation-dissipation interdit toute dépendance du spectre de fluctuations en fonction de paramètres dynamiques, comme par exemple la viscosité du solvant entourant la membrane (voir §I.1.2, Eq. I.1.5, p. 14). Pour une source de bruit hors équilibre, au contraire, le théorème fluctuation-dissipation ne s'applique plus et le spectre de fluctuations peut alors dépendre de la viscosité, comme c'est le cas pour la membrane du globule rouge. Il faut cependant rester prudent quant à l'interprétation des résultats des deux expériences citées ci-dessus [Levin and Korenstein, 1991, Tuvia et al., 1997]. En effet, il n'est pas évident que la technique expérimentale utilisée fournit véritablement une fonction de corrélation à temps égaux, auquel cas le résultat, même à l'équilibre thermodynamique, pourrait dépendre des paramètres dynamiques.

Jusqu'à récemment [Prost and Bruinsma, 1996, Prost et al., 1998], aucune théorie n'a tenu compte d'éventuels effets d'une source de bruit hors équilibre sur les fluctuations de membrane lipidique. Il serait pourtant nécessaire de réanalyser les expériences sur le scintillement des globules rouges à la lumière d'une telle théorie. Néanmoins, le globule rouge, même s'il constitue un exemple simple de cellule biologique, reste compliqué pour une description purement physique. Nous proposerons dans cette thèse un modèle théorique décrivant les fluctuations d'une membrane hors équilibre et un modèle expérimental plus simple que celui du globule rouge permettant de tester les résultats théoriques.

I.3.4.2 Objectifs de la thèse

Le but du travail présenté dans cette thèse est d'étudier les fluctuations de membranes hors équilibre. Comme nous l'avons souligné, ce passage par la physique hors équilibre est indispensable en vue d'une description physique plus réaliste et plus complète des membranes biologiques. Cette étape est évidente et nécessaire, mais n'a jamais été abordée jusqu'à présent.

Nous allons donc nous intéresser à des membranes dites 'actives', c'est-à-dire soumises à des processus actifs hors équilibre. Du point de vue de la physique statistique, une membrane active n'est pas à l'équilibre thermodynamique et possède une source de bruit actif non thermique, ne satisfaisant pas au théorème fluctuation-dissipation, qui se superpose au bruit thermique. Une membrane passive, à l'équilibre thermodynamique, est soumise uniquement au bruit thermique et le théorème fluctuation-dissipation est satisfait. La différence entre bruit actif et bruit thermique est assez fine mais se fait sentir au niveau des fluctuations de la membrane. Par exemple, le spectre de fluctuations de forme d'une membrane active peut dépendre de la viscosité du milieu, alors que celui d'une membrane passive ne peut pas en dépendre. Puisqu'une source de bruit se rajoute dans le cas d'une membrane active, on s'attend à une augmentation de l'amplitude des fluctuations en comparaison avec le cas d'une membrane passive. L'importance de cette amplification des fluctuations dépend des ordres de grandeur relatifs des forces exercées par le bruit actif ou par le bruit passif.

Estimons la force exercée sur la membrane par le mouvement brownien, avec les notations du paragraphe §I.1.3.1. A l'échelle microscopique a , pendant le temps de relaxation de la membrane $\tau_m(a)$ la force thermique F_{th} est de l'ordre de :

$$F_{th} \simeq \frac{1}{\tau_m(a)} \int_{\tau_m(a)} \int_{a^2} f_{th}(\mathbf{r}_-, t) d^2 \mathbf{r}_- dt.$$

En définissant la force locale exercée par le bruit thermique sur la membrane comme $F \equiv \langle F_{th}^2 \rangle^{1/2}$ et en utilisant le théorème fluctuation-dissipation (Eq. I.1.23, p. 22), on trouve une force :

$$F \simeq \frac{\sqrt{\kappa kT}}{a}.$$

Avec $a \simeq 0.5$ nm, $\kappa = 10 kT$, on trouve : $F \simeq 10^{-11}$ N.

La force active peut être estimée de plusieurs façons. La plus simple consiste à faire l'hypothèse que le bruit actif est généré par une dissipation d'énergie de l'ordre de kT à travers l'épaisseur e de la membrane. On trouve alors une force de l'ordre de $F \simeq kT/e \simeq 10^{-12}$ N. Des calculs plus précis seront présentés dans la suite (voir §II.4) mais aboutiront au même ordre de grandeur.

La force exercée par le bruit hors équilibre n'est donc pas négligeable devant celle d'origine thermique. Dans la suite, nous allons élaborer un modèle théorique de membrane active nous permettant d'inclure cette source de bruit hors équilibre dans le calcul du spectre de fluctuations. Nous verrons que le spectre de fluctuations est modifié par la présence du bruit hors équilibre et que, dans le cas où une membrane active fluctue près d'une paroi, il apparaît une nouvelle force

répulsive, dont l'origine est liée aux fluctuations de forme de la membrane (voir §I.1.2.3). Puis, nous montrerons à l'aide d'un modèle expérimental simple, l'importance des phénomènes hors équilibre sur les fluctuations de membranes lipidiques.

Deuxième partie

Théorie des membranes actives

Nous allons d'abord nous intéresser aux fluctuations d'une membrane active libre (§II.1) puis nous étudierons le cas d'une membrane active qui fluctue près d'une paroi (§II.2). Pour cela, nous disposons de deux approches théoriques. La première reprend les équations hydrodynamiques du §I.1.3.1 (Eq. I.1.22, p. 22) [Prost and Bruinsma, 1996], alors que la seconde utilise des arguments de lois d'échelle que nous allons développer dans la suite [Prost et al., 1998]. Dans les deux approches, nous utiliserons la même modélisation de l'activité détaillée ci-dessous.

On suppose que la membrane contient des protéines actives, par exemple des canaux ou des pompes ioniques. On désignera ces protéines sous le terme générique de 'centres actifs'. Du point de vue du modèle théorique, la condition pour avoir une membrane active est la présence d'une source de bruit hors équilibre – c'est-à-dire qui ne satisfait pas au théorème fluctuation-dissipation – pour les fluctuations de la membrane. Ce bruit actif doit donc avoir des caractéristiques différentes du bruit passif thermique (bruit blanc gaussien) : il pourra par exemple être de moyenne non nulle et corrélé spatialement ou temporellement. Dans notre modèle, le bruit actif est créé par les centres actifs et se superpose au bruit thermique.

Les hypothèses simplificatrices utilisées pour modéliser l'activité hors équilibre des centres actifs sont les suivantes :

- Les centres actifs peuvent diffuser librement dans la membrane avec un coefficient de diffusion noté D . La densité de centres actifs fluctue donc dans l'espace.
- Chaque centre actif exerce une force moyenne hors d'équilibre F_a sur la membrane ($F_a \neq 0$ si l'activité d'un centre actif n'est pas symétrique et s'exerce préférentiellement dans une direction).
- Les centres actifs n'exercent pas cette force de façon continue mais de façon aléatoire. La force est corrélée dans le temps sur un temps caractéristique τ . La fonction d'autocorrélation de la force active est donc, dans les cas les plus simples, de la forme : $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$ et l'activité des centres actifs fluctue dans le temps.

Avec ces hypothèses, le bruit hors équilibre est constitué de deux parties :

- Les fluctuations de densité de centres actifs sont caractérisées par la force moyenne F_a et par le temps de diffusion $\tau_D(L) \simeq L^2/D$.
- Les fluctuations de l'activité des centres actifs ou bruit de 'shot' (*shot noise*) sont caractérisées par l'amplitude de la fonction d'autocorrélation $I_0^{1/2}$ et par le temps d'autocorrélation τ .

On se placera enfin dans le cas particulier où la membrane est à l'état stationnaire : la membrane fluctue donc autour d'une forme moyenne qui n'évolue pas dans le temps. Cela nous permettra d'utiliser, comme au paragraphe §I.1.3 (p. 20), les fonctions de corrélation à temps égaux $\langle u(\mathbf{r}_-)^2 \rangle$ et $\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$.

Les notations utilisées dans la suite sont regroupées sur la figure II.1.1. On considère une portion de membrane plane infinie de taille $L \times L$ contenant N centres actifs. La position des centres actifs est désignée par $\mathbf{r}_- = \mathbf{R}_j(t)$ avec $j = 1, 2, \dots, N$ et la force exercée par le j ème centre actif est $F_j(t)$. On note $\rho = 1/l^2$ la densité moyenne de centres actifs sur la portion de membrane considérée, où l est la distance moyenne entre les centres actifs.

Chapitre II.1

Membrane libre

II.1.1 Modèle hydrodynamique

II.1.1.1 Equations hydrodynamiques d'une membrane active libre

Le modèle hydrodynamique, d'abord introduit par J. Prost et R. Bruinsma [Prost and Bruinsma, 1996, Prost et al., 1998], utilise les équations dynamiques écrites dans le référentiel de la membrane Eq. I.1.22 (p. 22) dans lesquelles on inclut une force active :

$$\begin{aligned} \eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r}, t)} \delta(z) \mathbf{k} + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= 0 \\ \frac{\partial u(\mathbf{r}_-, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z = 0, t) &= \lambda_p [\delta P(\mathbf{r}_-, t) + f_{th}(\mathbf{r}_-, t) + f_a(\mathbf{r}_-, t)]. \end{aligned} \quad (\text{II.1.1})$$

La force exercée par les centres actifs n'intervient que via une densité de force par unité de surface f_a dans l'équation de perméation (loi de Darcy). En effet, la force hors équilibre n'agit que sur la membrane et pas sur le fluide environnant. Les centres actifs font donc partie intégrante de la membrane. Si l'activité de l'ensemble des centres actifs n'est pas symétrique, c'est-à-dire si $F_a \neq 0$ et si l'orientation des centres actifs est asymétrique, de sorte que $\langle \int_S \int_t f_a(\mathbf{r}_-, t) d^2 \mathbf{r}_- dt \rangle \neq 0$, alors une force moyenne s'exerce sur la membrane et met la membrane en mouvement dans la direction z avec une vitesse $\lambda_p \rho F_a$. On ne tient pas compte de ce mouvement moyen dans la suite puisque les équations II.1.1 sont écrites dans le référentiel de la membrane.

La densité de force $f_a(\mathbf{r}_-, t)$ est reliée à la force exercée par un centre actif isolé $F_j(t)$ selon :

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

Comme nous l'avons discuté plus haut, la statistique de la force $F_j(t)$ dans le cas simple que nous considérons ici est donnée par :

$$\begin{aligned} \langle F_j(t) \rangle &= F_a \\ \langle F_j(t) F_{j'}(t') \rangle &= F_a^2 + \delta_{j,j'} I(t - t'), \end{aligned} \quad (\text{II.1.2})$$

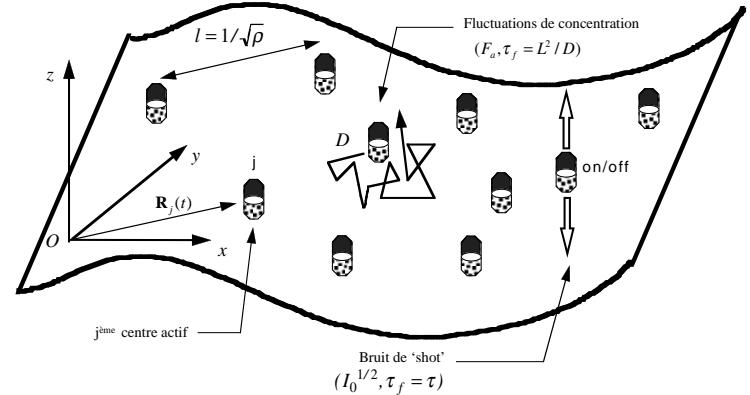


FIG. II.1.1: Notations utilisées pour le modèle théorique de membrane active.

où $I(t - t') = I_0 \exp(-(t - t')/\tau)$ est la fonction d'autocorrélation de la force et τ son temps d'autocorrélation.

A partir des équations II.1.2, on déduit les fonctions de corrélation pour la densité de force $f_a(\mathbf{r}_-, t)$:

$$\begin{aligned} \langle f_a(\mathbf{r}_-, t) \rangle &= \rho F_a \\ \langle \delta f_a(\mathbf{r}_-, t) \delta f_a(\mathbf{r}'_-, t') \rangle &= F_a^2 G_{coll}(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}'_-, t - t') + I(t - t') G_{ind}(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}'_-, t - t') \end{aligned} \quad (\text{II.1.3})$$

où $\delta f_a(\mathbf{r}_-, t) = f_a(\mathbf{r}_-, t) - \langle f_a(\mathbf{r}_-, t) \rangle$ est la fluctuation de force par unité de surface, et G_{coll} et G_{ind} sont respectivement les fonctions d'autocorrélation collectives et individuelles des centres actifs données par :

$$\begin{aligned} G_{coll}(\mathbf{r}_-, t) &\propto \frac{\rho}{D_{coll} t} \exp(-\mathbf{r}_-^2 / D_{coll} t) \\ G_{ind}(\mathbf{r}_-, t) &\propto \frac{\rho}{D_{ind} t} \exp(-\mathbf{r}_-^2 / D_{ind} t). \end{aligned}$$

A l'aide de l'équation II.1.3, on peut identifier les deux sources de bruit hors équilibre mentionnées précédemment : les fluctuations de densité de centres actifs caractérisées par la force F_a et le coefficient de diffusion D et les fluctuations de l'activité des centres actifs (bruit de 'shot') caractérisées par l'amplitude I_0 et le temps d'autocorrélation τ .

II.1.1.2 Spectre de fluctuations d'une membrane active

Des calculs analogues à ceux présentés au paragraphe §I.1.3.1 (p. 22) aboutissent à l'équation de Langevin vérifiée par le déplacement u de la membrane :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) = \lambda_p \left[f_{th}(\mathbf{q}_-, t) + \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \mathbf{k}}{q^2} dq_z + f_a(\mathbf{q}_-, t) \right], \quad (\text{II.1.4})$$

où

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

On peut ensuite résoudre cette équation (voir §I.1.3.1, p. 22) :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle &= \tau_m(\mathbf{q}_-) \int_0^\infty dt e^{-t/\tau} \left[\rho \lambda_p^2 F_a^2 \exp(-D_{coll} q_-^2 t/4) + \rho \lambda_p^2 I(t) \exp(-D_{ind} q_-^2 t/4) \right] \\ &\quad + \frac{kT}{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2}, \end{aligned} \quad (\text{II.1.5})$$

ce qui donne, pour une membrane active, le spectre de fluctuations suivant :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle &= \tau_m(\mathbf{q}_-) \left[\frac{\rho \lambda_p^2 F_a^2}{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} + D_{coll} q_-^2 / 4} + \frac{\rho \lambda_p^2 I_0}{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} + D_{ind} q_-^2 / 4 + \tau^{-1}} \right] \\ &\quad + \frac{kT}{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2}. \end{aligned} \quad (\text{II.1.6})$$

Le spectre de fluctuations d'une membrane active (Eq. II.1.6) est formé de la superposition du terme passif habituel ($kT/(\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2)$) provenant du bruit thermique (f_{th} et \mathbf{f}_h) et d'un nouveau terme venant du bruit actif (f_a). La contribution du bruit hors équilibre est complexe, et nous allons en simplifier l'expression au paragraphe suivant. Elle est constituée de deux parties. La première fait intervenir F_a et D_{coll} : il s'agit des fluctuations de densité des centres actifs. La seconde implique I_0 et D_{ind} : c'est le bruit de 'shot', c'est-à-dire les fluctuations de l'activité des centres actifs. En l'absence de centre actif $\rho = 0$ on retrouve bien l'expression habituelle du spectre de fluctuations d'une membrane à l'équilibre thermodynamique (Eq. I.1.5). Si les centres actifs n'exercent aucune force moyenne $F_a = 0$, la contribution des fluctuations de densité disparaît, mais l'effet de l'activité n'est pas nul puisqu'il subsiste la contribution du bruit de 'shot'. Notons enfin que ce résultat (Eq. II.1.6) est très général car un minimum d'hypothèses a été introduit pour décrire l'activité.

II.1.1.3 Limite des grandes longueurs d'onde

Cas d'une membrane sans tension

Pour une membrane sans tension $\sigma = 0$, l'expression II.1.6 se simplifie dans la limite où $q_- \rightarrow 0$:

$$\boxed{\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2}{\kappa D q_-^5} + \frac{kT}{\kappa q_-^4}.} \quad (\text{II.1.7})$$

Dans la limite des grandes longueurs d'onde, les fluctuations de densité dominent le bruit actif. L'effet de l'activité est alors proportionnel à la densité de centres actifs ρ et au carré de la force moyenne F_a . Si $\rho = 0$ ou $F_a = 0$, on retrouve bien le cas classique du spectre passif (Eq. I.1.5, p. 14). Remarquons aussi que les paramètres dynamiques η et λ_p interviennent dans l'équation

II.1.6 : ceci est dû au fait que le théorème fluctuation-dissipation ne s'applique pas pour une membrane hors équilibre contrairement au cas d'une membrane à l'équilibre thermodynamique où il impose l'absence de tout paramètre dynamique.

L'équation II.1.7 peut se réécrire :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4} \left(1 + \frac{\xi_a^{-1}}{q_-} \right), \quad (\text{II.1.8})$$

où $\xi_a = kTD/16\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2$ est une longueur caractéristique de l'activité des centres actifs. ξ_a diverge si on se rapproche de l'équilibre thermodynamique $\rho F_a^2 \rightarrow 0$. Si $q_- \rightarrow 0$, plus précisément si $q_- \ll \xi_a^{-1}$, c'est-à-dire aux échelles de longueur supérieures à ξ_a , le terme actif domine l'expression du spectre de fluctuations et le comportement en loi de puissance devient une loi en $1/q_-^5$. Il ne s'agit donc pas d'une simple renormalisation de la température.

On peut se demander comment la longueur de persistance de la membrane, définie au paragraphe §I.1.2.2 (p. 15), est affectée par ce changement du spectre de fluctuations. En effectuant le même calcul qu'auparavant (Eq. I.1.8, p. 15) et en utilisant cette fois le spectre actif de l'équation II.1.7, on trouve :

$$\ln(\xi_p/a) + r(\xi_p/\xi_a) = \frac{4\pi\kappa}{kT}, \quad (\text{II.1.9})$$

où a est comme précédemment le 'cut-off' moléculaire et r est un facteur numérique. Si on se rapproche de l'équilibre thermodynamique, ξ_a diverge et le terme logarithmique en ξ_p domine : on retrouve bien la longueur de persistance d'une membrane à l'équilibre thermodynamique [de Gennes and Taupin, 1982] : $\xi_p = a \exp(4\pi\kappa/kT)$. Si ξ_a est suffisamment petite, alors le terme linéaire en ξ_p dû à l'activité domine et la longueur de persistance devient :

$$\xi_p \propto \frac{\kappa}{kT} \xi_a.$$

La longueur de persistance est donc beaucoup plus petite si le spectre de fluctuations est dominé par le terme hors équilibre. Qualitativement, cela signifie qu'une membrane active est beaucoup plus froissée qu'une membrane passive.

Cas d'une membrane tendue

Si maintenant $\sigma \neq 0$ et $q_- \rightarrow 0$, le spectre d'une membrane active (Eq. II.1.6) devient :

$$\boxed{\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\sigma^2 q_-^2} + \frac{kT}{\sigma q_-^2}.} \quad (\text{II.1.10})$$

Contrairement au cas d'une membrane active sans tension, la loi de puissance est la même pour la partie active et pour la partie passive du spectre. Cette fois, il s'agit donc d'une simple renormalisation de la température. On peut donc réécrire l'équation II.1.10 en introduisant une température associée à la source de bruit actif T_{act} :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma q_-^2} \left(1 + \frac{T_{act}}{T} \right),$$

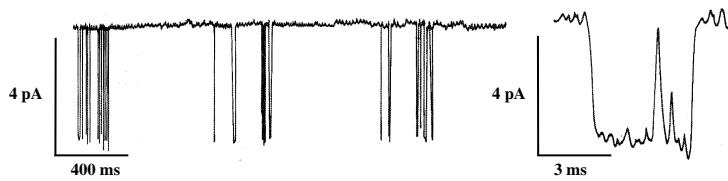


FIG. II.1.2: Exemple d'enregistrement de patch-clamp montrant la variation de l'intensité électrique en fonction du temps pour un canal récepteur d'acétylcholine en présence d'acétylcholine (d'après [Stryer, 1997]).

avec

$$T_{act} = \frac{16\eta^2\rho\lambda_p^2F_a^2}{k\sigma}.$$

En introduisant la température effective $T_{eff} = T + T_{act}$, on peut aussi écrire de façon équivalente :

$$\langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2 = \frac{kT_{eff}}{\sigma q^2}.$$

II.1.1.4 Cas particulier des canaux ioniques

Le modèle hydrodynamique décrit ci-dessus était destiné à l'origine à étudier le cas particulier où les centres actifs sont des canaux ioniques voltage-dépendants [Prost and Bruinsma, 1996]. Ces canaux ont été décrits au paragraphe §I.2.3.1 (p. I.2.3.1). Rappelons ici quelquesunes de leurs principales caractéristiques. Par la technique du *patch-clamp* [Sakmann and Neher, 1983], on peut enregistrer le courant qui traverse un canal unique au cours du temps (voir Fig. II.1.2). On observe de brusques décharges, de l'ordre de quelques pA, correspondant au passage d'environ 5000 ions en 10^{-3} s. Le modèle de Stevens [Stevens, 1972, Anderson and Stevens, 1973] décrit la statistique d'ouverture-fermeture du canal par un système à deux niveaux : la variable aléatoire $S_j(t)$ vaut 1 si le jème canal est ouvert et vaut 0 sinon. La probabilité d'ouverture du canal est notée p et son temps d'autocorrélation est τ . Les fonctions de corrélation de $S_j(t)$ sont alors données par :

$$\begin{aligned} \langle S_j(t) \rangle &= p \\ \langle S_j(t)S_{j'}(t') \rangle &= p^2 + \delta_{j,j'}p(1-p)e^{-(t-t')/\tau}. \end{aligned} \quad (\text{II.1.11})$$

Si on note $\zeta(\mathbf{r}_-, t) = \sum_j S_j(t)\delta(\mathbf{r}_- - \mathbf{R}_j(t))$, on a alors $\langle \zeta \rangle = pp$. Les fonctions de corrélation de $S_j(t)$ (Eqs. II.1.11) sont analogues à celles de $F_j(t)$ (Eqs. II.1.2). Si on suppose de plus que les canaux sont libres de diffuser dans la membrane, nous sommes bien ramenés au même problème que précédemment.

Dans le cas de canaux ioniques, on peut décrire plus précisément le passage de l'eau et des ions à travers la membrane. Le flux d'eau à travers le jème canal est noté J_j et I_j^\pm désigne

le flux d'ions, où on suppose que seulement deux ions monovalents, notés + et -, de charges opposées $\pm q_e$ sont transportés. Les flux d'eau et d'ions vérifient les équations phénoménologiques de transport hors équilibre suivantes [Finkelstein, 1984, Levitt, 1984] :

$$J_j = \Lambda_{11}(\delta P_j - \delta\Pi_j) + \Lambda_{12}(\delta\mu_j^+ + \delta\mu_j^-) \quad (\text{II.1.12})$$

$$I_j^\pm = \Lambda_{21}(\delta P_j - \delta\Pi_j) + \Lambda_{22}(\delta\mu_j^\pm), \quad (\text{II.1.13})$$

où δP est la différence de pression à travers la membrane, $\delta\Pi$ la différence de pression osmotique et $\delta\mu$ la différence de potentiel électrochimique. La pression osmotique vaut $\Pi = kT(c^+ + c^-)$ et le potentiel électrochimique est donné par $\mu^\pm = \pm q_e\phi + kT\ln c^\pm$, où c^\pm désigne la concentration des ions et ϕ est le potentiel électrique. La neutralité de la solution impose que localement $c^+ \simeq c^-$.

Le fluide vérifie toujours l'équation d'incompressibilité et l'équation de Stokes :

$$\begin{aligned} \eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) &= 0. \end{aligned}$$

La concentration des ions $c = (c^+ + c^-)/2$ suit une loi de diffusion classique, et le potentiel obéit à la loi de Poisson :

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla c &= D \nabla^2 c \\ \nabla^2 \phi &= 0. \end{aligned}$$

Pour spécifier les conditions aux limites, on impose au passage de la membrane une variation de concentration $\Delta c \ll \bar{c}$ où \bar{c} est la concentration ionique moyenne, une variation de pression ΔP compensée par la force élastique $\delta\mathcal{H}/\delta u(\mathbf{r}_-, t)$ (voir Eq. I.1.20, p. 22), et une différence de potentiel électrique $\Delta\phi$ à travers la membrane (voir Fig. II.1.3).

En combinant les équations du mouvement dans le référentiel de la membrane et les équations de transport avec les conditions aux limites ci-dessus, un calcul au premier ordre redonne une équation de Langevin de la même forme que celle de l'équation II.1.4 [Prost and Bruinsma, 1996] :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}u(\mathbf{q}_-, t) = F_{th}(\mathbf{q}_-, t) + \Phi \sum_j S_j(t) \exp(i\mathbf{q}_- \cdot \mathbf{R}_j(t)),$$

où F_{th} est le bruit d'origine thermique, $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = (\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2)(\lambda_p + 1/4\eta q_-)$ et où le coefficient de perméation λ_p et le flux Φ représentant l'amplitude du bruit hors équilibre peuvent s'exprimer de façon explicite en fonction des paramètres phénoménologiques Λ_{ij} , ΔP , Δc , $\Delta\phi$, p et ρ [Prost and Bruinsma, 1996]. On trouve :

$$\Phi = \frac{\tilde{J} \left[\left(\frac{\Lambda_{12}}{\bar{c}} - \Lambda_{11} \right) \frac{2\Delta c}{\langle \zeta \rangle} + \Lambda_{11} \frac{\Delta P}{kT\langle \zeta \rangle} \right] + (\Lambda_{11}\Lambda_{22} - 2\Lambda_{12}^2)\Delta P}{\Lambda_{22} - 4\bar{c}\Lambda_{21} + 2\bar{c}^2\Lambda_{11} + \frac{\tilde{J}}{kT\langle \zeta \rangle}}, \quad (\text{II.1.14})$$

et

$$\lambda_p = \langle \zeta \rangle \frac{\Lambda_{11} \frac{\tilde{J}}{kT\langle \zeta \rangle} + \Lambda_{11}\Lambda_{22} - 2\Lambda_{12}^2}{\Lambda_{22} - 4\bar{c}\Lambda_{21} + 2\bar{c}^2\Lambda_{11} + \frac{\tilde{J}}{kT\langle \zeta \rangle}}, \quad (\text{II.1.15})$$

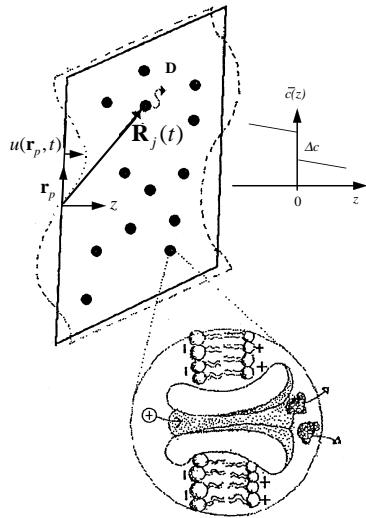


FIG. II.1.3: Modèle théorique utilisé pour décrire le cas particulier de canaux ioniques (d'après [Prost and Bruinsma, 1996]). On impose une variation Δc de la concentration ionique moyenne $c(z)$ à travers la membrane située en $z = 0$.

où $\bar{J} = \langle \varsigma \rangle (\Lambda_{21} \Delta P + (\Lambda_{22}/\bar{c} - 2\Lambda_{21})kT\Delta c)$ est le flux moyen d'ions à travers les canaux, et $\langle \varsigma \rangle = \rho p$ représente l'activité des canaux. L'idée du calcul est donc un peu différente de celle du calcul précédent (voir §II.1.1.1) puisqu'ici, le coefficient de perméation de la membrane n'est pas une constante donnée *a priori* mais peut être calculée en fonction des coefficients de transport.

Dans le cas particulier des canaux ioniques, on obtient à la limite $q_- \rightarrow 0$, une longueur caractéristique de l'activité (voir Eq. II.1.8) :

$$\xi_a = \frac{kTD}{16\eta\rho\Phi^2}.$$

Ce cas particulier présente l'avantage d'exprimer explicitement l'amplitude du bruit hors équilibre Φ en fonction de paramètres mesurables. Nous donnerons quelques ordres de grandeur au paragraphe §II.4.

II.1.2 Modèle de loi d'échelle

L'approche théorique basée sur des arguments de loi d'échelle a été développée pour comprendre le comportement d'une membrane active fluctuant au voisinage d'une paroi. Comme nous l'avons vu au §I.1.3.2 (p. 25), l'hydrodynamique d'une membrane au voisinage d'une paroi fait intervenir des termes non-linéaires si $u \simeq d$. Plutôt que de résoudre les équations non-linéaires, nous avons envisagé une approche en loi d'échelle ayant pour but final le calcul de la force répulsive hors équilibre exercée par une paroi sur une membrane active. Bien entendu, cette approche ne fournira que les comportements en loi de puissance et ne permettra pas d'obtenir les préfacteurs numériques de façon précise. Nous avons tout d'abord testé la méthode sur le cas d'une membrane libre pour retrouver les spectres de fluctuation d'une membrane libre passive (Eq. I.1.5, p. 14) ou active (Eq. II.1.6).

II.1.2.1 Méthode utilisée

On considère une portion de membrane de taille $L \times L$ que l'on divise en petits carrés de taille $b \times b$ où b est une distance de coupure (*cut-off*) que l'on précisera. L'idée de la méthode est d'identifier le mécanisme de relaxation dominant et la principale source de bruit à l'échelle de longueur L puis de sommer dans le temps et l'espace toutes les fluctuations sur les petits carrés élémentaires de taille $b \times b$.

Dans le cas d'une membrane libre, on dispose d'une équation de Langevin de la forme (voir Eq. I.1.30, p. 23 et Eq. II.1.4) :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) \propto f(\mathbf{q}_-, t),$$

où $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = (\lambda_p + 1/4\eta q_-)(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4)$ est le taux de relaxation de la membrane et f est la densité de force fluctuante. La force fluctuante peut agir sur la membrane en surface – c'est le

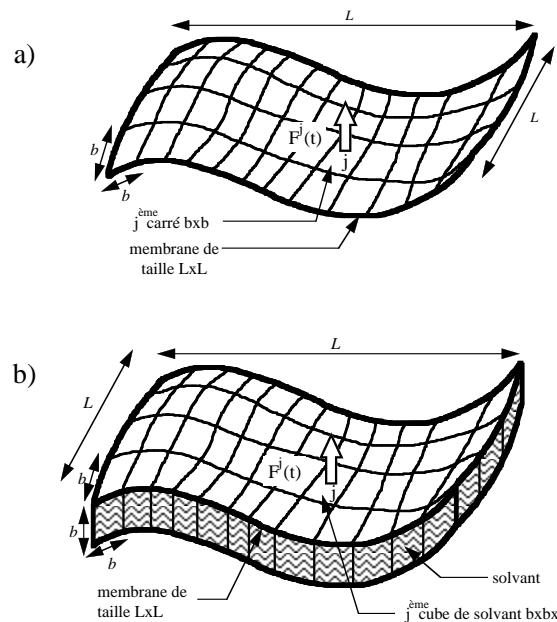


FIG. II.1.4: Description schématique de la méthode de loi d'échelle. a) Cas d'une force surfacique : la membrane de taille $L \times L$ est divisée en carrés de taille $b \times b$. b) Cas d'une force volumique, par exemple d'origine hydrodynamique : on divise alors le volume de solvant entourant la membrane en cubes de volume $b \times b \times b$.

cas pour le bruit thermique lié à la perméation $f_{th}(\mathbf{q}_-, t)$ et pour la force active $f_a(\mathbf{q}_-, t)$ – ou en volume – comme pour le bruit thermique lié à l'hydrodynamique $\mathbf{f}_h(\mathbf{q}_-, t)$ –. On choisit pour valeur de b la longueur de cohérence de la force f : on notera $\tau_f(b)$ son temps d'autocorrélation et $F(b)$ son amplitude. Cela signifie que la force fluctuante agit microscopiquement sur une surface $b \times b$ (si f est surfacique) ou sur un volume $b \times b \times b$ (si f est volumique), pendant un temps $\tau_f(b)$ avec une amplitude $F(b)$ (voir Fig. II.1.4). Dans la suite, on étudiera toujours séparément chacune des quatre sources possibles de bruit (bruit thermique perméatif, bruit thermique hydrodynamique, bruit actif de 'shot' et bruit actif dû aux fluctuations de densité). Ceci est justifié par le fait qu'il n'existe aucune corrélation entre ces quatre sources de bruit : à l'ordre harmonique, on peut donc traiter le problème complet de l'effet du bruit sur les fluctuations d'une membrane active comme la superposition des effets de ces quatre sources de bruit prises individuellement.

La membrane répond aux ‘coups’ de la force fluctuante en relaxant vers sa position d’équilibre de deux façons : par un mécanisme perméatif avec un temps caractéristique $\tau_m(L)^{-1} = \lambda_p(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$ si $L < \eta \lambda_p$, ou par un mécanisme hydrodynamique avec un temps

caractéristique $\tau_m(L)^{-1} = (L/4\eta)(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$ si $L > \eta \lambda_p$. Le temps $\tau_m(L)$ caractérise donc la durée de vie d'une fluctuation. Si $\tau_m(L) > \tau_f(b)$, alors la membrane reçoit $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau_f(b)$ coups pendant qu'elle relaxe, sur la surface élémentaire b^2 dans le cas d'une force surfacique ou dans le volume élémentaire b^3 dans le cas d'une force volumique. Si $\tau_m(L) < \tau_f(b)$, nous poserons $N_\tau(L) = 1$. C'est la somme des $N_\tau(L)$ coups portés par la force fluctuante sur un site élémentaire qui donne naissance aux fluctuations de forme de la membrane. En effet, d'après le théorème de la limite centrale, tous ces coups ne se compensent pas et on obtient en moyenne une fluctuation de la force exercée sur un site élémentaire égale à $\pm F(b)\sqrt{N_\tau(L)}$.

Pour obtenir la réponse de la membrane à l'échelle L , il faut sommer les contributions de tous les sites élémentaires. Le nombre total de sites élémentaires est $N_s(L) = (L/b)^2$ si la force est surfacique et $N_s(L) = (L/b)^3$ si la force est volumique. Pour intégrer correctement dans l'espace les fluctuations de la force sur les $N_s(L)$ sites, il faut savoir si les sites élémentaires sont indépendants spatialement ou non. La force fluctuante n'est pas corrélée dans l'espace s'il s'agit du bruit thermique lié à la perméation ou du bruit actif de 'shot'. En revanche, il existe des corrélations spatiales pour le bruit thermique lié à l'hydrodynamique et pour le bruit actif dû aux fluctuations de densité des centres actifs. Nous allons donc distinguer deux cas selon que la force fluctuante est corrélée dans l'espace ou non.

Force fluctuante sans corrélation spatiale

On peut de nouveau appliquer le théorème de la limite centrale s'il n'existe pas de corrélation spatiale entre les sites élémentaires. On trouve alors, pour les fluctuations de la force :

$$F(L) \propto \pm F(b)\sqrt{N_\tau(L)N_s(L)}. \quad (\text{II.1.16})$$

Si on note $u(b)$ le déplacement élémentaire dû à la force $F(b)$, on trouve par les mêmes arguments un déplacement de la membrane moyen sur les $N_s(L)$ sites élémentaires égal à :

$$u(L) \propto \pm u(b)\sqrt{N_\tau(L)N_s(L)}.$$

On déduit le carré moyen des fluctuations $\langle u(L)^2 \rangle$, correspondant au spectre de fluctuations $\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$:

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{N_\tau(L)}{N_s(L)} u(b)^2.$$

Cette loi d'échelle s'appliquera pour les cas de relaxation par la perméation ($L < \lambda_p\eta$) et si on s'intéresse au bruit hors équilibre dû aux fluctuations de l'activité des centres actifs (bruit de 'shot'). Dans les deux cas, la force fluctuante est surfacique donc $N_s(L) = (L/b)^2$ et :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \left(\frac{b}{L}\right)^2 N_\tau(L) u(b)^2 \quad (\text{II.1.17})$$

Force fluctuante avec corrélation spatiale

Cette fois, les sites élémentaires ne sont pas indépendants et on ne peut pas appliquer directement le théorème de la limite centrale. Puisque les sites élémentaires peuvent bouger de façon cohérente, on s'attend à ce que le déplacement moyen de la membrane $u(L)$ soit plus important que dans le cas d'une force fluctuante sans corrélation spatiale. On doit donc multiplier le résultat obtenu précédemment par un facteur d'échelle correctif $\Gamma(L/b) > 1$ qui ne dépend que du rapport L/b :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \Gamma(L/b) \left(\frac{b}{L}\right)^2 N_\tau(L) u(b)^2. \quad (\text{II.1.18})$$

Dans le cas particulier où la force fluctuante est d'origine hydrodynamique, on peut exprimer explicitement le facteur d'échelle $\Gamma(L/b)$ [Prost et al., 1998]. En effet, on a dans ce cas un déplacement total de la membrane égal à $u_{tot}(L) \propto \pm u(b) \sqrt{N_\tau(L) N_s(L)}$ avec $N_s(L) = (L/b)^3$ puisque la force s'applique dans le volume b^3 . En divisant à nouveau la membrane en petits carrés de taille $b \times b$ et en moyennant sur ces $(L/b)^2$ petits carrés, on trouve :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{b}{L} N_\tau(L) u(b)^2. \quad (\text{II.1.19})$$

Dans le cas de fluctuations d'origine hydrodynamique, le facteur d'échelle vaut $\Gamma(L/b) = L/b$. La loi d'échelle Eq. II.1.19 s'appliquera pour les cas de relaxation par l'hydrodynamique ($L > \lambda_p \eta$). Si on s'intéresse au bruit hors équilibre dû aux fluctuations de densité des centres actifs, la force est là encore corrélée spatialement : on appliquera encore la formule Eq. II.1.18.

II.1.2.2 Retour sur le cas d'une membrane passive

Pour tester l'exactitude des deux lois d'échelle trouvées au paragraphe précédent, on peut tout d'abord essayer de retrouver le spectre de fluctuations d'une membrane passive.

Dans le cas d'une membrane passive, la force fluctuante f est le bruit thermique surfacique f_{th} , si la relaxation par la perméation domine ($L < \lambda_p \eta$) ou bien le bruit thermique volumique f_h si la relaxation par l'hydrodynamique domine ($L > \lambda_p \eta$).

Régime perméatif

Lorsque la relaxation par la perméation domine ($a \ll L \ll \lambda_p \eta$), on a $\tau_m(L)^{-1} = \lambda_p(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$. La taille caractéristique sur laquelle s'exerce la force f_{th} est le 'cut-off' moléculaire a , on prend donc $b = a$. Le temps caractéristique du bruit thermique dans le régime perméatif est $\tau_m(a)$. On trouve l'amplitude F_j de la force fluctuante agissant sur le jème carré élémentaire de taille a^2 en intégrant la densité de force f_{th} sur le carré élémentaire a^2 pendant le temps $\tau_m(a)$:

$$F_j \propto \frac{1}{\tau_m(a)} \int_{\tau_m(a)} dt \int_{a^2} f_{th}(\mathbf{r}_-, t) d^2 \mathbf{r}_-.$$

L'amplitude de la force fluctuante est donnée par $F(a)^2 = \langle F_j^2 \rangle$. En utilisant le théorème fluctuation-dissipation (Eq. I.1.23, p. 22), on trouve :

$$F(a) \propto a \sqrt{\frac{kT}{\lambda_p \tau_m(a)}}.$$

Le déplacement moyen à l'échelle a est relié à la force $F(a)$ par l'équation de Langevin Eq. I.1.30 (p. 23) :

$$u(a) \simeq \lambda_p \tau_m(a) \frac{F(a)}{a^2}.$$

On en déduit :

$$u(a) \propto \frac{1}{a} \sqrt{\lambda_p \tau_m(a) kT}.$$

On utilise donc la loi d'échelle Eq. II.1.17 avec :

- $b = a$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = \lambda_p(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau_m(a)$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau_m(a)$;
- Déplacement élémentaire : $u(b) = u(a) \propto a^{-1} \sqrt{\lambda_p \tau_m(a) kT}$.

On en déduit :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma + \kappa L^{-2}}. \quad (\text{II.1.20})$$

Pour une membrane sans tension (ou si $L \ll \sqrt{\kappa/\sigma}$), on retrouve bien le spectre de fluctuations (Eq. I.1.6, p. 14) :

$$\langle u(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{kT}{\kappa}} L.$$

Pour une membrane tendue (ou si $L \gg \sqrt{\kappa/\sigma}$), les arguments en loi d'échelle présentés ci-dessus donnent :

$$\langle u(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{kT}{\sigma}}.$$

On ne retrouve pas le comportement logarithmique de l'équation I.1.7 (p. 15). Il s'agit d'un problème intrinsèque à la méthode de loi d'échelle qui ne peut rendre compte que de comportements en loi de puissance. En terme d'arguments d'échelle, ce résultat pour une membrane tendue est équivalent à $\langle u(L)^2 \rangle = L^0 = cte$.

Régime hydrodynamique

On suppose maintenant que c'est la relaxation par l'hydrodynamique qui domine ($L \gg \lambda_p \eta$). La démonstration est analogue à celle effectuée dans le cas où la relaxation par la perméation domine. On a maintenant $\tau_m(L)^{-1} = (1/4\eta)(\sigma L^{-1} + \kappa L^{-3})$. La taille caractéristique sur laquelle s'exerce la force f_h est la longueur de coupure entre les régimes perméatif et hydrodynamique $\lambda_p \eta$,

on prend donc $b = \lambda_p \eta$. Le temps caractéristique du bruit thermique dans le régime perméatif est $\tau_m(b)$. Enfin, on trouve l'amplitude \mathbf{F}_j de la force fluctuante hydrodynamique agissant sur le jème cube élémentaire de taille b^3 en intégrant la densité de force \mathbf{f}_h sur le cube élémentaire b^3 pendant le temps $\tau_m(b)$:

$$\mathbf{F}_j \propto \frac{1}{\tau_m(b)} \int_{\tau_m(b)} dt \int_{b^3} \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) d^3 \mathbf{r}.$$

L'amplitude de la force fluctuante est : $F(b)^2 = \langle \mathbf{F}_j^2 \rangle$. En utilisant le théorème fluctuation-dissipation (Eq. I.1.24 p. 22), on obtient :

$$F(b) \propto \sqrt{\frac{\eta b k T}{\tau_m(b)}}.$$

Le déplacement moyen à l'échelle b est relié à la force $F(b)$ par l'équation de Langevin Eq. I.1.30 (p. 23) :

$$u(b) \simeq \frac{\tau_m(b)}{\eta b} F(b).$$

On en déduit :

$$u(b) \propto \sqrt{\frac{\tau_m(b) k T}{\eta b}}.$$

On utilise donc la loi d'échelle Eq. II.1.19 avec :

- $b = \lambda_p \eta$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (1/4\eta)(\sigma L^{-1} + \kappa L^{-3})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau_m(b)$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau_m(b)$;
- Déplacement élémentaire : $u(b) \propto \tau_m(b) k T / \eta b$.

Là encore, on retrouve bien le spectre de fluctuation d'une membrane passive :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma + \kappa L^{-2}}.$$

La méthode de loi d'échelle nous a donc permis de retrouver le spectre de fluctuations d'une membrane passive dans les régimes perméatif et hydrodynamique. Contrairement à la méthode classique décrite au paragraphe I.1.2.2, le résultat a été établi ici à l'aide d'arguments dynamiques.

II.1.2.3 Application au cas d'une membrane active

Comme nous venons de le faire pour les sources de bruit thermique f_p et \mathbf{f}_h , essayons de retrouver le spectre de fluctuations d'une membrane active (Eq. II.1.6) à l'aide des lois d'échelle Eq. II.1.17 et Eq. II.1.18.

Le bruit hors équilibre f_a est constitué de deux parties : les fluctuations de densité des centres actifs et le bruit de 'shot' de l'activité des centres actifs. Nous allons examiner séparément ces deux contributions.

Fluctuations de densité des centres actifs

Si les centres actifs exercent une force moyenne non nulle F_a , alors la force due à l'activité fluctue à cause des variations de densité des centres actifs (voir Eq. II.1.2, p. 95). Cette force est corrélée à l'échelle de la portion de membrane considérée L puisqu'elle met en jeu des fluctuations de la concentration des centres actifs sur toute la surface $L \times L$. La taille caractéristique sur laquelle la force due aux fluctuations de densité s'applique est donc $b = L$. Son temps caractéristique est le temps de diffusion des centres actifs : $\tau_f(b) = \tau_f(L) = L^2/D$.

L'amplitude de la force élémentaire par unité de surface $b^2 = L^2 F(b = L)$ due aux fluctuations de densité des centres actifs est donnée par le théorème de la limite centrale :

$$F(L) \propto \frac{F_a}{L^2} \sqrt{N_s(L)} = \frac{\sqrt{\rho} F_a}{L},$$

puisque l'on a $N_s(L) = L^2/l^2$ centres actifs sur la surface L^2 , où $l = 1/\sqrt{\rho}$ est la distance moyenne entre les centres actifs.

Pour calculer le déplacement élémentaire $u(b)$, on utilise l'équation de Langevin Eq. II.1.4 où on ne considère que la densité de bruit actif f_a . Si la membrane est sans tension, alors $\tau_f(L) = L^2/D \ll \tau_m(L) = L^4/(\kappa(\lambda_p + L/4\eta))$: le terme de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}u$ dans l'équation de Langevin est donc négligeable devant $\partial u / \partial t$ et on trouve :

$$u(b) \simeq \lambda_p \tau_f(L) F(L) \simeq \lambda_p \tau_f(L) \frac{\sqrt{\rho} F_a}{L}.$$

En revanche, pour une membrane tendue, $\tau_f(L) = L^2/D \gg \tau_m(L) = L^2/(\sigma(\lambda_p + L/4\eta))$ si L est suffisamment grand et c'est cette fois le terme $\partial u / \partial t$ qui est négligeable devant le terme de relaxation. On trouve alors :

$$u(b) \simeq \lambda_p \tau_m(L) F(L) \simeq \lambda_p \tau_m(L) \frac{\sqrt{\rho} F_a}{L}.$$

Puisqu'il existe des corrélations spatiales, on applique la loi d'échelle Eq. II.1.18, dans laquelle $\Gamma(L/b) = \Gamma(1)$ est une constante numérique qui jouera le rôle d'une simple constante de proportionnalité :

- $b = L$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (\lambda_p + L/4\eta)(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau_f(L) = L^2/D$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)D/L^2$ pour une membrane sans tension et $N_\tau(L) = 1$ pour une membrane tendue (puisque l'on a alors $\tau_m(L) \ll \tau_f(L)$) ;
- Déplacement élémentaire : $u(b) \simeq \lambda_p \tau_f(L) \sqrt{\rho} F_a / L$ pour une membrane sans tension et $u(b) \simeq \lambda_p \tau_m(L) \sqrt{\rho} F_a / L$ pour une membrane tendue.

On trouve finalement, pour une membrane sans tension :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\rho \lambda_p F_a^2}{D \kappa} \frac{L^4}{1 + L/4\lambda_p \eta}. \quad (\text{II.1.21})$$

A la limite des grandes longueurs d'onde $L \rightarrow \infty$, on retrouve bien le spectre de fluctuations actif (Eq. II.1.7) :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\eta \rho \lambda_p^2 F_a^2}{D\kappa} L^3,$$

puisque le comportement en $1/q_-^5$ du spectre $\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$ en fonction du vecteur d'onde donne après intégration sur q_- un comportement en L^3 pour le spectre correspondant $\langle u(L)^2 \rangle$ en fonction de la taille L de la membrane considérée.

Pour une membrane tendue, on obtient :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\rho F_a^2}{\sigma^2} \frac{L^2}{(1 + L/4\lambda_p\eta)^2}. \quad (\text{II.1.22})$$

Aux grandes longueurs d'onde, on simplifie l'expression ci-dessus et on retrouve bien l'équation II.1.10 :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\sigma^2},$$

puisque un comportement en $1/q_-^2$ donne, après intégration, un terme logarithmique que notre méthode en loi d'échelle reproduit par un terme constant. Comme nous l'avons vu au paragraphe §II.1.1.3, on peut traduire l'effet de l'activité par une température associée au bruit hors équilibre :

$$T_{act} = \frac{\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{k\sigma}.$$

Bruit de 'shot'

Le bruit dû aux fluctuations de l'activité des centres actifs s'exerce sur une distance typique égale à $l = 1/\sqrt{\rho}$. On pose donc $b = 1/\sqrt{\rho}$. Le temps d'autocorrélation de la force $\tau_f(b) = \tau$ ne dépend pas de L . L'amplitude de la force fluctuante élémentaire par unité de surface $b^2 = 1/\rho$ est $\rho I_0^{1/2}$. L'équation de Langevin II.1.4 fournit ensuite le déplacement élémentaire :

$$u(b) \simeq \lambda_p \tau \rho I_0^{1/2},$$

puisque, pour une membrane tendue ou sans tension, on a toujours $\tau_m(L) \ll \tau_f(b) = \tau$ et on peut négliger le terme de relaxation $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}u(\mathbf{q}_-, t)$ devant $\partial u(\mathbf{q}_-, t)/\partial t$.

L'activité des centres actifs n'étant pas corrélée entre deux centres actifs différents, on applique la loi d'échelle Eq. II.1.17 avec :

- $b = 1/\sqrt{\rho}$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (\lambda_p + 1/4\eta L^{-1})(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau$;
- Déplacement élémentaire : $u(b) \simeq \lambda_p \tau \rho I_0^{1/2}$.

On obtient :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho \tau \lambda_p I_0}{(1 + L/\lambda_p\eta)(\sigma + \kappa L^{-2})}. \quad (\text{II.1.23})$$

Ce terme a été négligé dans la limite des grandes longueurs d'onde (voir §II.1.1.3). On voit en effet qu'il se comporte comme $1/L$ si $L \rightarrow \infty$ et reste toujours petit devant la contribution des fluctuations de densité (terme en L^3 pour une membrane sans tension et terme constant pour une membrane tendue).

II.1.2.4 Conclusions

Récapitulons les différentes lois d'échelle trouvées jusqu'à présent pour une membrane libre.

Pour une membrane passive avec une relaxation de la membrane par la perméation ou par l'hydrodynamique :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \begin{cases} (kT/\kappa)L^2, & \sigma = 0 \\ kT/\sigma, & \sigma \neq 0 \end{cases} \quad (\text{II.1.24})$$

Pour une membrane active soumise uniquement à des fluctuations de densité des centres actifs, dans la limite $L \rightarrow \infty$, c'est-à-dire dans le cas où la relaxation par le flux hydrodynamique domine :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \begin{cases} (\eta \rho \lambda_p^2 F_a^2 / D\kappa)L^3 & \sigma = 0 \\ (\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2 / \sigma^2) & \sigma \neq 0 \end{cases} \quad (\text{II.1.25})$$

Enfin, pour une membrane active soumise uniquement à des fluctuations de l'activité des centres actifs (bruit de 'shot') dans la limite des grandes longueurs d'onde :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0}{(\sigma + \kappa L^{-2})L} \quad (\text{II.1.26})$$

Pour une membrane sans tension, dans la limite des grandes longueurs d'onde $L \rightarrow \infty$, le comportement en loi de puissance en L^3 des fluctuations de densité des centres actifs domine le comportement thermique en L^2 . On s'attend donc à une augmentation de l'amplitude des fluctuations si on active une membrane initialement passive.

Pour une membrane tendue, les effets de l'activité sont moins spectaculaires puisque la loi de puissance reste la même et qu'on assiste simplement à une augmentation de la température effective : $T_{eff} = T + T_{act}$ avec $T_{act} > 0$. Néanmoins, cela correspond bien à l'addition d'une nouvelle source de bruit, donc encore à une augmentation de l'amplitude des fluctuations.

Qualitativement, ces lois d'échelle permettent de prévoir une amplification des fluctuations de forme d'une membrane sous l'effet d'une source de bruit hors équilibre. Il est nécessaire de connaître les préfacteurs de ces lois d'échelle pour estimer quantitativement l'effet attendu. Quelques ordres de grandeur seront donnés au chapitre II.4.

Chapitre II.2

Membrane en présence d'une paroi

La dynamique d'une membrane fluctuant près d'une paroi est différente de celle d'une membrane libre. Les fortes non-linéarités qui apparaissent à cause des conditions aux limites rendent difficile une résolution analytique. Après avoir mis en évidence la nécessité de prendre en compte les termes non-linéaires pour décrire la pression répulsive (voir §II.2.1), nous montrerons que les arguments en loi d'échelle décrits au chapitre précédent sont particulièrement bien adaptés pour résoudre le problème. Nous montrerons que la présence d'une paroi amplifie les fluctuations de forme d'une membrane active (voir §II.2.2) et, qu'en conséquence, la nouvelle pression répulsive exercée sur une membrane active est plus importante que celle exercée sur une membrane passive (voir §II.2.3).

II.2.1 Importance des termes non-linéaires dans l'hydrodynamique d'une membrane près d'une paroi

II.2.1.1 Équations hydrodynamiques dans l'approximation de lubrification

Les équations hydrodynamiques sont les mêmes qu'au paragraphe §II.1.1 (voir Eq. II.1.1, p. 95), avec les mêmes conditions aux limites sur la membrane. On doit imposer en plus la condition limite sur la paroi $\mathbf{v}(z = -d, t) = 0$. Sans approximation, ces équations sont non-linéaires puisqu'apparaissent des termes en $(d + u)^3$ liés à la conservation du flux entre la paroi et la membrane (voir §I.1.3.2, p. 26) [Prost et al., 1998].

L'approximation de lubrification associée à la condition de linéarisation $u \ll d$ nous a permis de montrer au paragraphe §I.1.3.2 (p. 26) que le déplacement de la membrane suit l'équation de Langevin I.1.33. Comme précédemment, l'introduction d'une densité de force hors équilibre f_a se traduit par l'apparition d'un nouveau terme dans l'équation de Langevin Eq. I.1.33 (p. 26) :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) = \lambda_p \left[f_{th}(\mathbf{r}_-, t) + \frac{d^3 q_-^2}{\eta \lambda_p} \tilde{P}(\mathbf{q}_-, t) + f_a(\mathbf{r}_-, t) \right], \quad (\text{II.2.1})$$

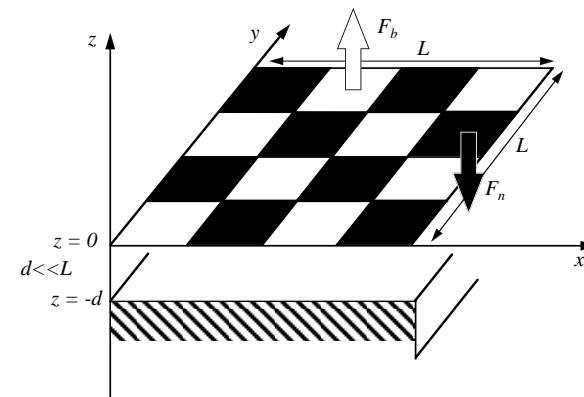


FIG. II.2.1: Rectification des forces en présence d'une paroi. Le damier de taille $L \times L$ initialement plan en $z = 0$ se déforme sous l'effet des forces verticales vers le haut F_b (en blanc) et vers le bas F_n (en noir).

où

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{d^3 q_-^2}{12\eta} \right) (\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4).$$

Pour que la condition de linéarisation $u \ll d$ reste valide, il faut $q_- \gg 1/L_c$, où L_c est la longueur de collision.

II.2.1.2 Effet de rectification des forces en présence d'une paroi

La force répulsive entropique a été mise en évidence par des arguments statiques (voir §I.1.2.3, p. 18). Un calcul dynamique de cette force est rendu très compliqué par la présence des interactions hydrodynamiques à longue portée entre la membrane et la paroi et les effets non-linéaires discutés plus haut.

Pour comprendre l'importance des termes non-linéaires, on considère un modèle simple où la membrane est un damier de taille $L \times L$ de cases noires et blanches placé à une distance d d'une paroi. On suppose qu'une force verticale vers le bas F_n s'exerce sur les cases noires et qu'une force verticale vers le haut F_b s'exerce sur les cases blanches (voir Fig. II.2.1). On note $u_b(t)$ le déplacement des cases blanches et $u_n(t)$ celui des cases noires. On impose que la forme moyenne du damier reste un plan situé en $z = 0$. On a donc conservation du flux : le flux de solvant qui monte sous les cases blanches est compensé par le flux de solvant qui descend sous les cases noires. On en déduit $u_b = -u_n = u$.

Les forces exercées par le damier sur le fluide F_n et F_b sont compensées par la dissipation vis-

queuse. D'après la formule de Reynolds [Landau and Lifchitz, 1990a], les vitesses de déplacement des cases sont reliées aux forces par :

$$\frac{du_i}{dt} \simeq \frac{(u_i + d)^3}{\eta L^4} F_i,$$

où $i = n$ pour les cases noires et $i = b$ pour les cases blanches. On trouve donc :

$$\frac{F_n}{F_b} = \left(\frac{d+u}{d-u} \right)^3.$$

La force moyenne exercée par le damier sur le fluide situé entre le damier et la paroi est proportionnelle à $-(F_n - F_b)\mathbf{k}$. Le fluide transmet donc à la paroi une force par unité de surface égale à $\propto -(F_n - F_b)/L^2\mathbf{k}$. On en déduit la pression exercée par la paroi sur le damier :

$$P \propto F_b \left(\left(\frac{d+u}{d-u} \right)^3 - 1 \right) / L^2. \quad (\text{II.2.2})$$

Si on utilise l'hypothèse de linéarisation $u \ll d$, les forces F_n et F_b se compensent et la pression exercée par la paroi est nulle. Les fluctuations de forme du damier u_n et u_b sont symétriques mais donnent naissance, via la non-linéarité de l'interaction hydrodynamique, à des forces F_n et F_b qui ne sont pas symétriques. La présence de la paroi 'rectifie' les forces de sorte que la force verticale vers le haut F_b l'emporte sur la force dirigée vers le bas F_n .

Ces arguments s'appliquent aussi dans le cas d'une membrane fluide fluctuant près d'une paroi : il est indispensable de tenir compte des effets non-linéaires pour décrire la pression entropique exercée par une paroi sur une membrane. L'équation de Langevin linéarisée Eq. II.2.1 ne permettra donc pas de résoudre le problème posé. Il faut soit revenir aux équations hydrodynamiques non-linéaires, soit utiliser une méthode différente, comme par exemple, la méthode de lois d'échelle décrite précédemment.

II.2.2 Effet d'amplification des fluctuations

II.2.2.1 Effet de la présence d'une paroi sur le temps de relaxation de la membrane

Si on compare les taux de relaxation d'une membrane libre $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = (\lambda_p + 1/4\eta q_-)(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4)$ à celui d'une membrane en présence d'une paroi $\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = (\lambda_p + d^3 q_-^2/12\eta)(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4)$, on s'aperçoit que, pour les petits vecteurs d'onde, le temps de relaxation d'une membrane près d'une paroi est bien plus long que celui d'une membrane libre.

Pour une membrane passive, le théorème fluctuation-dissipation impose que cette augmentation du temps de relaxation soit compensée par une diminution de l'amplitude du bruit thermique. Le spectre de fluctuations ne peut donc pas dépendre des paramètres dynamiques. En revanche, puisque le théorème fluctuation-dissipation ne s'applique pas pour une membrane hors

équilibre, l'augmentation du temps de relaxation de la membrane active en présence d'une paroi doit modifier son spectre de fluctuations. La force active pourra agir sur la membrane pendant un temps plus long lors de la relaxation de la membrane. Le nombre de coups N_τ accumulés pendant la durée de vie d'une fluctuation sera donc plus élevé pour une membrane près d'une paroi et on s'attend à une amplification de l'amplitude des fluctuations.

La longueur de collision L_c joue un rôle central dans le calcul de la force répulsive. Au paragraphe §I.1.2.3 (p. 18), nous l'avons définie comme étant la longueur telle que :

$$\langle u(L_c)^2 \rangle = d^2. \quad (\text{II.2.3})$$

Dans le cas d'une membrane passive, le spectre de fluctuations n'étant pas modifié par la présence de la paroi, on peut toujours utiliser l'équation II.1.24 pour calculer la longueur de collision. Pour une membrane active au contraire, on ne pourra pas se servir des équations II.1.25 et II.1.26, car on s'attend à ce qu'elles soient modifiées en présence d'une paroi. On doit donc recalculer le spectre de fluctuations d'une membrane active en présence d'une paroi.

II.2.2.2 Spectre de fluctuation en présence d'une paroi et longueur de collision d'une membrane active

Comme nous l'avons remarqué au paragraphe §I.1.3.2 (p. 26), les fluctuations de petite longueur d'onde $L < d$ ne sont pas modifiées par la paroi. On va donc d'intéresser au domaine $L \gg d$. La membrane relaxe vers sa position d'équilibre par un mécanisme perméatif si $L \gg L^*(d)$ et par un mécanisme hydrodynamique si $L \ll L^*(d)$, avec $L^*(d) = d^{3/2}/\sqrt{\lambda_p \eta}$ (voir p. 27).

Dans le régime perméatif, la présence de la paroi n'intervient pas, puisque les interactions ne sont pas médies par l'hydrodynamique et que d n'intervient pas dans les équations : on peut utiliser le spectre de fluctuations d'une membrane libre (Eqs. II.1.25 et II.1.26) pour calculer la longueur de collision.

Dans le régime hydrodynamique, on doit recalculer le spectre de fluctuations avec les deux contributions possibles au bruit hors équilibre : les fluctuations de densité des centres actifs et le bruit de 'shot'. Pour cela, nous allons utiliser exactement les mêmes arguments de loi d'échelle que ceux du §II.1.2.1, en utilisant le temps de relaxation de la membrane en présence d'une paroi au lieu de celui de la membrane libre : $\tau_m(L) = d^3 L^{-2}/12\eta(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$. On pourra ensuite calculer la longueur de collision à l'aide de l'équation II.2.3 en supposant que les conditions $d \ll L_c(d) \ll L^*(d)$ sont bien vérifiées.

Fluctuations de densité des centres actifs

Régime perméatif

Dans le régime perméatif $L \gg L^*(d)$, on utilise le spectre de fluctuations calculé pour une membrane libre (Eqs. II.1.21 et II.1.22) et la définition de la longueur de collision donnée par

l'équation II.2.3.

- Pour une membrane sans tension, on trouve la longueur de collision suivante :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{D\kappa}{\rho\lambda_p F_a^2} \right)^{1/4} d^{1/2}.$$

- Pour une membrane tendue, on obtient :

$$L_c(d) \propto \frac{\sigma}{\rho^{1/2} F_a} d.$$

Régime hydrodynamique

Dans le régime hydrodynamique $L \ll L^*(d)$, on recalcule le spectre de fluctuations avec la même méthode qu'au paragraphe §II.1.2.3. On applique la loi d'échelle Eq. II.1.18 avec :

- $b = L$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (d^3 L^{-2}/12\eta)(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau_f(L) = L^2/D$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)D/L^2$ pour une membrane sans tension et $N_\tau(L) = 1$ pour une membrane tendue (on a en effet $\tau_m(L) < \tau_f(b)$ car, même si $\tau_f(L) \propto L^2$ et $\tau_m(L) \propto L^4$, la condition pour rester dans le régime hydrodynamique impose $L^*(d) \gg L$) ;
- Déplacement élémentaire : $u(b) \simeq \lambda_p \tau_f(L) \sqrt{\rho} F_a / L$ pour une membrane sans tension et $u(b) \simeq \lambda_p \tau_m(L) \sqrt{\rho} F_a / L$ pour une membrane tendue.

- Pour une membrane sans tension, on trouve :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2}{\kappa D} \frac{L^6}{d^3}.$$

On déduit la longueur de collision à partir de la définition Eq. II.2.3 :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\kappa D}{\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2} \right)^{1/6} d^{5/6}.$$

- Pour une membrane tendue, on a :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2 L^6}{\sigma^2} \frac{L^6}{d^6}.$$

Puis, on trouve la longueur de collision :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\sigma^2}{\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2} \right)^{1/6} d^{4/3}.$$

En comparant les deux spectres de fluctuation obtenus ci-dessus dans le régime hydrodynamique pour une membrane en présence d'une paroi à celui d'une membrane libre (Eqs. II.1.25),

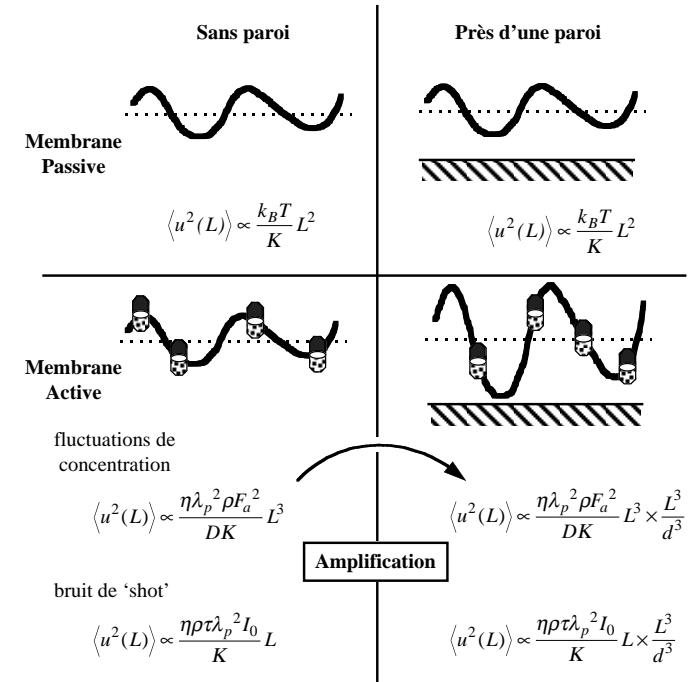


FIG. II.2.2: Schéma résumant l'effet d'une paroi sur les fluctuations d'une membrane sans tension passive ou active.

on voit que dans le cas d'une membrane sans tension, la présence de la paroi amplifie l'amplitude des fluctuations d'un facteur $(L/d)^3$. Dans le cas d'une membrane tendue, le facteur d'amplification $(L/d)^6$ est encore plus élevé. La figure II.2.2 résume cet effet d'amplification des fluctuations. On remarque aussi que, à la limite $L \rightarrow d$, le spectre de fluctuations d'une membrane libre et celui d'une membrane interagissant avec une paroi sont bien identiques.

Bruit de 'shot'

Régime perméatif

Dans le régime perméatif $L \gg L^*(d)$, on utilise le spectre de fluctuations d'une membrane libre (Eq. II.1.23) et la condition Eq. II.2.3.

- Pour une membrane sans tension, on trouve la longueur de collision suivante :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\kappa}{\rho \tau \lambda_p I_0} \right)^{1/2} d.$$

- Pour une membrane tendue, le spectre ne dépend pas de L puisque $\langle u(L)^2 \rangle \propto \rho \tau \lambda_p I_0 / \sigma$. L'amplitude des fluctuations reste donc toujours inférieure à la distance à la paroi d : il n'y a aucune collision avec la paroi.

Régime hydrodynamique

Dans le régime hydrodynamique $L \ll L^*(d)$, on recalcule le spectre de fluctuations avec la méthode du §II.1.2.3. On applique la loi d'échelle Eq. II.1.17 avec :

- $b = 1/\sqrt{\rho}$;
- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (\lambda_p + d^3 L^{-2}/12\eta)(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(b) = \tau$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau$;
- Déplacement élémentaire : $u(b) \simeq \lambda_p \tau \rho I_0^{1/2}$.

On trouve le spectre suivant :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0}{(\sigma + \kappa L^{-2}) L} \frac{L^3}{d^3}.$$

- Puis, on en déduit la longueur de collision d'une membrane sans tension :

$$L_c \propto \left(\frac{\kappa}{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0} \right)^{1/4} d^{5/4}.$$

- Et pour une membrane tendue :

$$L_c \propto \left(\frac{\sigma}{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0} \right)^{1/2} d^{5/2}.$$

Si on compare au cas d'une membrane libre dans le régime hydrodynamique (Eq. II.1.26), l'effet de la paroi correspond là encore à une amplification des fluctuations : le facteur multiplicatif est $(L/d)^3$ pour une membrane sans tension comme pour une membrane tendue (voir Fig. II.2.2). Enfin, si $L \rightarrow d$, on retrouve bien le spectre de fluctuations d'une membrane libre.

II.2.3 Pression hors équilibre exercée par une paroi sur une membrane active

Nous avons démontré que si une membrane active fluctue près d'une paroi, son temps de relaxation augmentant, les forces actives agissent plus longtemps et les fluctuations se trouvent amplifiées par rapport à celles d'une membrane libre. On s'attend donc à l'apparition d'une nouvelle force répulsive hors équilibre pour une membrane active, selon les arguments du paragraphe §I.1.2.3. La méthode en loi d'échelle va nous permettre d'obtenir des renseignements précis sur la portée de la nouvelle force répulsive, ainsi que des indications sur son amplitude. Nous appliquerons d'abord la méthode de loi d'échelle sur une membrane passive fluctuant près d'une paroi pour contrôler à nouveau que nous retrouvons les résultats connus à l'équilibre thermodynamique (voir §I.1.2.3, Eqs. I.1.14 et I.1.16, p. 19). On étudiera ensuite la pression hors équilibre exercée par une paroi sur une membrane active.

II.2.3.1 Arguments de loi d'échelle pour la pression exercée par une paroi

Comme nous l'avons fait pour le spectre de fluctuations d'une membrane libre au paragraphe §II.1.2.1 (Eqs. II.1.17 et II.1.18), nous allons démontrer les lois d'échelle vérifiées par la pression $P(d)$ dans les cas où les forces fluctuantes sont corrélées spatialement ou non.

Les effets d'une paroi ne se font sentir si la longueur d'onde des fluctuations est plus petite que la distance d séparant la position moyenne de la membrane et la paroi. Pour des fluctuations de longueurs d'onde plus petites que d , il n'y aura donc pas de rectification. Pour des modulations de plus grande longueur d'onde, l'amplitude des fluctuations devient comparable à d et les longueurs d'onde supérieures à la longueur de collision sont coupées par la présence de la paroi, ce qui donne naissance à une force asymétrique. Cet effet de rectification a été illustré au paragraphe §II.2.1.2 : les fluctuations qui contribuent de façon significative à la pression sont telles que $u \simeq d$, donc celles de longueur d'onde de l'ordre de L_c (voir Eq. II.2.2). Cela a plusieurs conséquences sur les arguments d'échelle développés précédemment : i) on doit se restreindre à l'étude de membrane de taille L vérifiant $d \ll L \ll L_c$, ii) on doit prendre $b = d$ pour la distance de coupure ('cut-off') iii) on s'intéresse aux forces à l'échelle $L = L_c$.

On divise de nouveau la surface $L_c \times L_c$ en petits carrés élémentaires de taille $d \times d$. On a donc $N_s(L_c) = (L_c/d)^2$ carrés élémentaires. Le temps de relaxation de la membrane est $\tau_m(L_c)$. On note $F(d)$ la force fluctuante à l'échelle d agissant sur la surface élémentaire $d \times d$ et $\tau_f(d)$

le temps d'autocorrélation de la force. Le nombre de 'chocs' reçus par la membrane pendant la durée de vie d'une fluctuation est donc $N_\tau(L_c) = \tau_m(L_c)/\tau_f(d)$ si $\tau_m(L_c) > \tau_f(d)$. On posera encore $N_\tau(L_c) = 1$ si $\tau_m(L_c) < \tau_f(d)$.

Force fluctuante sans corrélation spatiale

En appliquant le théorème de la limite centrale, on retrouve l'équation II.1.16 : $F(L_c) \propto \pm F(d) \sqrt{N_\tau(L_c) N_s(L_c)}$. La pression exercée par la force fluctuante $F(L_c)$ sur la membrane moyen-née sur le temps de vie d'une fluctuation est donc :

$$P(d) \propto \pm \sqrt{\frac{N_s(L_c)}{N_\tau(L_c)} \frac{F(d)}{L_c^2}}.$$

Pour des fluctuations symétriques, on trouve une pression moyenne nulle. Mais la présence de la paroi assymétrise les fluctuations. On tient compte de l'effet de rectification dû aux termes non-linéaires en ne conservant que les forces agissant sur la membrane dirigée vers le haut, c'est-à-dire que l'on ne garde que les forces de signe positif dans l'équation ci-dessus. La pression suit donc la loi d'échelle suivante si la force fluctuante n'est pas corrélée dans l'espace :

$$\langle P(d) \rangle \propto \sqrt{\frac{N_s(L_c)}{N_\tau(L_c)} \frac{F(d)}{L_c^2}}. \quad (\text{II.2.4})$$

Force fluctuante avec corrélation spatiale

Dans le cas où la force est corrélée dans l'espace, on peut reprendre les étapes du calcul du §II.1.2.1 [Prost et al., 1998] ou directement poser $b = d = L_c$ puisque la force est alors corrélée sur toute la membrane de taille L_c^2 . On trouve alors :

$$\langle P(d) \rangle \propto \sqrt{\frac{1}{N_\tau(L_c)} \frac{F(L_c)}{L_c^2}}. \quad (\text{II.2.5})$$

II.2.3.2 Retour sur le cas d'une membrane passive : force de Helfrich

Montrons d'abord que les lois d'échelle II.2.4 et II.2.5 permettent de retrouver l'expression de la pression entropique de Helfrich pour une membrane à l'équilibre thermodynamique (Eqs. I.1.14 et I.1.16, p. 19).

On calcule la longueur de collision définie par la condition $\langle u(L_c)^2 \rangle \simeq d^2$ (Eq. II.2.3) à l'aide du spectre de fluctuations d'une membrane passive obtenu au paragraphe §II.1.2.2 :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \begin{cases} (kT/\kappa)L^2 & \sigma = 0 \\ kT/\sigma & \sigma \neq 0. \end{cases}$$

On obtient la longueur de collision d'une membrane passive :

$$L_c \propto \begin{cases} \sqrt{\kappa/kT}d & \sigma = 0 \\ \infty & \sigma \neq 0. \end{cases}$$

On retrouve bien l'expression de la longueur de collision pour une membrane passive sans tension trouvée au paragraphe §I.1.2.3 (Eq. I.1.13, p. 19). Pour une membrane tendue, le spectre de fluctuations ne dépend pas de L : la technique de loi d'échelle ne permet pas de reproduire le comportement exponentiel de la longueur de collision (Eq. I.1.15, p. 19) et donne une longueur de collision infinie.

Régime perméatif

Si $L_c \gg L^*(d)$, la membrane relaxe par la perméation. Le temps de relaxation de la membrane n'est pas affecté par la présence de la paroi. Le raisonnement est donc exactement le même qu'au §II.1.2.2. On utilise donc la loi d'échelle Eq. II.2.4 avec :

- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = \lambda_p(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(d) = \tau_m(d)$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L)/\tau_m(d)$;
- Force élémentaire : $F(d) = d\sqrt{kT/\lambda_p\tau_m(d)}$.

On trouve :

$$\langle P(d) \rangle \propto \begin{cases} \sqrt{\kappa kT}/L_c^3 & \sigma = 0 \\ \sqrt{\sigma kT}/L_c^2 & \sigma \neq 0. \end{cases}$$

En remplaçant L_c par l'expression de la longueur de collision trouvée plus haut, on déduit la pression entropique exercée par la paroi sur la membrane :

$$\langle P(d) \rangle \propto \begin{cases} (kT)^2/\kappa d^3 & \sigma = 0 \\ 0 & \sigma \neq 0. \end{cases}$$

De par la nature même de la méthode utilisée, ce résultat ne peut pas rendre compte de la dépendance exponentielle décroissante de la pression en fonction de d dans le cas d'une membrane tendue (Eq. I.1.14, p. 19). En revanche, dans le cas d'une membrane passive sans tension, on retrouve bien le résultat connu (Eq. I.1.16, p. 19) :

$$P(d) \propto \frac{(kT)^2}{\kappa d^3}.$$

Régime hydrodynamique

Les fluctuations de la force hydrodynamique sont corrélées. On utilise par conséquent la loi d'échelle II.2.5. Cette fois, le temps de relaxation est modifié par la présence de la paroi : $\tau_m(L) = d^3 L^{-2}/12\eta(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$. On doit donc recalculer la force élémentaire $F(L_c)$. En utilisant le théorème fluctuation-dissipation (Eq. I.1.35, p. 27), on trouve [Prost et al., 1998] :

$$F(L_c) \propto L_c^2 \sqrt{\frac{\eta kT}{d^3 \tau_f(L_c)}}.$$

On utilise donc la loi d'échelle Eq. II.2.5 avec :

- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L)^{-1} = (d^3 L^{-2}/\eta)(\sigma L^{-2} + \kappa L^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(L_c) = \tau_m(L_c)$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $N_\tau(L) = \tau_m(L_c)/\tau_m(L_c) = 1$;
- Force élémentaire : $F(L_c) = L_c^2 \sqrt{\eta kT/d^3 \tau_f(L_c)}$.

On obtient à nouveau $\langle P(d) \rangle \propto \sqrt{\kappa kT/L_c^3}$ soit :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{(kT)^2}{\kappa d^3},$$

pour une membrane sans tension, et $\langle P(d) \rangle \propto \sqrt{\sigma kT/L_c^2}$, soit :

$$\langle P(d) \rangle \simeq 0,$$

pour une membrane tendue.

On retrouve bien, par des arguments dynamiques, la force entropique de Helfrich dans les régimes perméatif et hydrodynamique. La méthode de loi d'échelle est donc efficace pour rendre compte des effets non linéaires de rectification des forces exercées par la paroi sur la membrane.

II.2.3.3 Application au cas d'une membrane active : pression hors équilibre

Nous allons maintenant appliquer les lois d'échelle Eqs. II.2.4 et II.2.5 pour trouver la pression hors équilibre appliquée sur une membrane active qui fluctue près d'une paroi. Comme au paragraphe §II.1.2.3, nous étudions séparément les deux contributions au bruit hors équilibre : le bruit dû aux fluctuations de densité des centres actifs et celui dû à la statistique de l'activité des centres actifs. En appliquant les conditions $L_c \gg d$ et $L_c \gg L^*(d)$ dans le régime perméatif ou $d \ll L_c \ll L^*(d)$ dans le régime hydrodynamique, avec $L^*(d) = (d^3/\eta\lambda_p)^{1/2}$, nous pouvons déduire le domaine de validité de chaque résultat en fonction de d .

Fluctuations de densité des centres actifs

Lorsque les fluctuations ont pour origine les variations de densité de centres actifs, la force est corrélée dans l'espace et on utilise la loi d'échelle Eq. II.2.5 :

$$\langle P(d) \rangle = \sqrt{\frac{\tau_f(L_c)}{\tau_m(L_c)}} \frac{F(L_c)}{L_c^2}.$$

On détermine la force $F(L_c)$ à partir de l'équation II.1.3 : $F(L_c) = \rho^{1/2} L_c F_a$. Les autres paramètres qui interviennent dans l'équation Eq. II.2.5 sont :

- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L_c)^{-1} = (\lambda_p + d^3 L_c^{-2}/\eta)(\sigma L_c^{-2} + \kappa L_c^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(L_c) = L_c^2/D$;
- Nombre de coups reçus par la membrane : $\tau_f(L_c)$ dépend de L_c , il faudra donc poser $N_\tau(L_c) = \tau_m(L_c)/\tau_f(L_c) = 1$ si $\tau_m(L_c) < \tau_f(L_c)$;

- Force élémentaire : $F(L_c) = \rho^{1/2} L_c F_a$.

Régime perméatif

- Pour une membrane sans tension, dans le régime perméatif, on a $\tau_m(L_c) \gg \tau_f(L_c)$ et $L_c \propto (D\kappa/\rho\lambda_p F_a^2)^{1/4} d^{1/2}$. On trouve la pression hors équilibre suivante :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\rho\lambda_p F_a^2}{D} \frac{1}{d}.$$

Ce résultat est valable si $d \ll (D\kappa/\rho\lambda_p F_a^2)^{1/2}$ et si $d \ll (\eta\lambda_p)^{1/2} (D\kappa/\rho\lambda_p F_a^2)^{1/4}$.

- Pour une membrane tendue, dans le régime perméatif, $\tau_m(L_c) \simeq \tau_f(L_c)$ donc on pose $N_\tau(L_c) = 1$ dans la loi d'échelle Eq. II.2.5. On utilise la longueur de collision trouvée précédemment dans ce régime, $L_c \propto (\sigma/\rho^{1/2} F_a)d$, pour obtenir :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\rho F_a^2}{\sigma} \frac{1}{d}.$$

Cette expression de la pression est valable pour $\sigma \gg \rho^{1/2} F_a$ et $d \ll (\eta\lambda_p\sigma^2)/(\rho F_a^2)$.

Régime hydrodynamique

- Pour une membrane sans tension, dans le régime hydrodynamique, on vérifie que $\tau_m(L_c) \gg \tau_f(L_c)$ et on utilise la longueur de collision $L_c \propto (\kappa D/\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2)^{1/6} d^{5/6}$. La pression moyenne est donc :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\rho\lambda_p F_a^2}{D} \frac{1}{d}.$$

Le domaine de validité de cette expression est donné par : $d \ll (\kappa D)/(\eta\rho\lambda_p^2 F_a^2)$ et $d \gg (\eta\lambda_p)^{1/2} (D\kappa/\rho\lambda_p F_a^2)^{1/4}$.

- Enfin, pour une membrane tendue, dans le régime hydrodynamique, on a $\tau_m(L_c) < \tau_f(L_c)$ donc on pose de nouveau $N_\tau(L_c) = 1$ dans l'équation II.2.5 (voir la discussion au paragraphe §II.2.2.2). La longueur de collision est donnée par $L_c \propto (\sigma^2/\eta^2\rho\lambda_p^2 F_a^2)^{1/6} d^{4/3}$. Toujours à l'aide de la loi d'échelle Eq. II.2.5, on trouve :

$$\langle P(d) \rangle \propto \left(\frac{\eta\rho^2\lambda_p F_a^4}{\sigma} \right)^{1/3} \frac{1}{d^{4/3}},$$

avec les conditions de validité suivantes : $d \gg (\eta\rho^{1/2}\lambda_p F_a)/(\sigma)$ et $d \gg (\eta\lambda_p\sigma^2)/(\rho F_a^2)$.

Bruit de 'shot'

Supposons maintenant que les fluctuations aient pour origine les variations de l'activité même des centres actifs (bruit de 'shot'). La force n'est pas corrélée dans l'espace et on applique la loi d'échelle Eq. II.2.4 :

$$\langle P(d) \rangle = \frac{L_c}{d} \sqrt{\frac{\tau_f(L_c)}{\tau_m(L_c)}} \frac{F(d)}{L_c^2}.$$

On détermine la force $F(d)$ à partir de l'équation II.1.3 : $F(d) = \rho^{1/2} d I_0^{1/2}$. Les autres paramètres de l'équation Eq. II.2.5 sont donnés par :

- Temps de réponse de la membrane : $\tau_m(L_c)^{-1} = (\lambda_p + d^3 L_c^{-2}/\eta)(\sigma L_c^{-2} + \kappa L_c^{-4})$;
- Temps d'autocorrélation de la force fluctuante : $\tau_f(L_c) = \tau$.
- Nombre de coups reçus par la membrane : τ ne dépend pas de L_c , on aura donc toujours $\tau_m(L_c) \gg \tau_f(L_c)$;
- Force élémentaire : $F(L_c) = \rho^{1/2} d I_0^{1/2}$.

Régime perméatif

- Pour une membrane sans tension, dans le régime perméatif, on a $L_c \propto (\kappa/\rho\tau\lambda_p I_0)^{1/2} d$ donc, d'après la loi d'échelle Eq. II.2.4 :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{(\rho\tau\lambda_p I_0)^2}{\kappa} \frac{1}{d^3}.$$

Les conditions de validité sont : $\kappa \gg \rho\tau\lambda_p I_0$ et $d \ll (\eta\lambda_p)(\kappa/\rho\tau\lambda_p I_0)$.

- Pour une membrane tendue, dans le régime perméatif, on a vu au paragraphe §II.2.2.2 que le spectre de fluctuations en présence de paroi ne dépend pas de L : $\langle u(L)^2 \rangle \propto \rho\tau\lambda_p I_0/\sigma$, ce qui indique l'absence de collision entre la membrane et la paroi dans ce régime, c'est-à-dire si $d \gg (\rho\tau\lambda_p I_0/\sigma)^{1/2}$ (voir ci-dessous), et donc :

$$\langle P(d) \rangle \propto 0.$$

Régime hydrodynamique

- Pour une membrane sans tension, dans le régime hydrodynamique, la longueur de collision est donnée par : $L_c \propto (\kappa/\eta\rho\tau\lambda_p^2 I_0)^{1/4} d^{5/4}$. On en déduit la pression hors équilibre :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\eta^{1/2} \rho^{3/2} \tau^{3/2} \lambda_p^2 I_0^{3/2}}{\kappa^{1/2}} \frac{1}{d^{7/2}},$$

avec le domaine de validité suivant : $d \gg (\eta\rho\tau\lambda_p^2 I_0)/\kappa$ et $d \gg (\eta\kappa)/(\rho\tau I_0)$.

- Enfin, toujours dans le régime hydrodynamique, mais pour une membrane tendue, on a obtenu la longueur de collision : $L_c \propto (\sigma/\eta\rho\tau\lambda_p^2 I_0)^{1/2} d^{5/2}$. On calcule la pression à l'aide de la loi d'échelle Eq. II.2.4 :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\eta\rho^{2\tau^2} \lambda_p^3 I_0^2}{\sigma} \frac{1}{d^6}.$$

Ce résultat est valable si $d \gg (\eta\rho\tau\lambda_p^2 I_0/\sigma)^{1/3}$ et $d \ll (\rho\tau\lambda_p I_0/\sigma)^{1/2}$.

II.2.3.4 Conclusions

L'approche en loi d'échelle nous a permis de retrouver les résultats connus concernant la force de Helfrich exercée par une paroi sur une membrane à l'équilibre thermodynamique, puis d'élargir ce concept de pression induite par les fluctuations au cas d'une membrane active. Les résultats trouvés donnent les lois de puissance attendues pour la pression hors équilibre $P(d)$, pour

	Sans tension		Tendue	
	Hydrodynamique	Perméatif	Hydrodynamique	Perméatif
Fluctuations de concentration	$\alpha = 1$ $\delta = \lambda_p F_a/D$	$\alpha = 1$ $\delta = \lambda_p F_a/D$	$\alpha = 4/3$ $(\delta = \eta\lambda_p F_a/\rho\sigma)^{1/6}$	$\alpha = 1$ $\delta = F_a/\sigma$
Bruit de 'shot'	$\alpha = 7/2$ $\delta = (\eta\rho\tau^3 \lambda_p^4 I_0^2/\kappa)^{1/7}$	$\alpha = 3$ $\delta = (\rho\tau^2 \lambda_p^2 I_0^{3/2}/\kappa)^{1/3}$	$\alpha = 6$ $\delta = (\eta\rho\tau^2 \lambda_p^3 I_0^{3/2}/\sigma)^{1/6}$	0

TAB. II.2.1: Récapitulatif des résultats obtenus pour la pression hors équilibre dans les différents régimes étudiés. La pression est mise sous la forme $\langle P(d) \rangle \propto P_0(\delta/d)^\alpha$, où P_0 est une pression, δ est une longueur et α est l'exposant de la loi d'échelle.

une membrane sans tension ou pour une membrane tendue, dans les régimes où la relaxation de la membrane est dominée par la perméation ou par l'hydrodynamique. Nous avons aussi obtenu les préfacteurs, même s'ils ne peuvent être déterminés qu'à un coefficient numérique de proportionnalité près à cause de la nature même de la méthode de loi d'échelle. Enfin, nous avons calculé le domaine de validité de chaque régime en fonction de la distance d séparant la membrane et la paroi.

La pression hors équilibre peut se mettre sous la forme :

$$\langle P(d) \rangle \propto P_0 \left(\frac{\delta}{d} \right)^\alpha,$$

où P_0 a les dimensions d'une pression et δ est une longueur. Pour le bruit actif dû aux fluctuations de densité des centres actifs, on a : $P_0 = \rho F_a$, et pour le bruit de 'shot' : $P_0 = \rho I_0^{1/2}$. Le tableau II.2.1 résume les valeurs de la longueur δ et de l'exposant α qui caractérisent la portée de l'interaction entre la paroi et la membrane.

L'effet le plus spectaculaire de l'activité sur la pression est obtenu dans le cas d'une membrane tendue. A l'équilibre thermodynamique, la force entropique est à très courte portée puisqu'elle décroît exponentiellement (ce dont la méthode de loi d'échelle rend compte par une pression nulle). Lorsque du bruit hors équilibre apparaît, la décroissance de la force en fonction de d devient une loi de puissance – sauf dans le cas du bruit de 'shot' en régime perméatif où la décroissance reste exponentielle – avec une portée exceptionnellement longue en $1/d$ ou $1/d^{4/3}$ dans le cas des fluctuations de densité des centres actifs.

Pour une membrane sans tension, le bruit actif ajoute une contribution hors équilibre à la pression classique en $1/d^3$. La pression hors équilibre est de portée comparable dans le cas du bruit de 'shot', puisqu'elle se comporte comme $1/d^3$ ou $1/d^{7/2}$. En revanche, dans le cas des fluctuations de densité des centres actifs, la contribution hors équilibre est de nouveau en $1/d$: la portée de la force hors équilibre est alors beaucoup plus grande que celle de la force due aux fluctuations thermiques.

Qualitativement, on s'attend donc à une forte amplification de la répulsion lorsqu'une source de bruit hors équilibre pour les fluctuations de forme de la membrane est présente. On peut

ainsi prévoir une transition de décollement (*unbinding transition*) analogue à celle décrite au paragraphe §I.1.2.3 (p. 20) si on ‘allume’ une source de bruit non thermique. Quelques estimations plus quantitatives des effets attendus seront données au chapitre II.4.

Nous allons examiner successivement le cas d'une membrane active polymérisée libre, à l'aide du modèle hydrodynamique du paragraphe §II.1.1 et du modèle en loi d'échelle du paragraphe §II.1.2, puis celui d'une membrane active polymérisée en présence d'une paroi, à l'aide du modèle en loi d'échelle décrit aux paragraphes §§II.2.2 et II.2.3.

Chapitre II.3

Modèles plus complets de membrane active

Nous présentons ici rapidement quelques compléments apportés au modèles précédents. Nous nous sommes intéressés au cas d'une membrane polymérisée, essentiellement en vue d'une ré-interprétation des résultats expérimentaux sur les globules rouges présentés au paragraphe §I.3.3.2 (§II.3.1). Dans le cadre du modèle hydrodynamique développé pour les canaux ioniques (voir §II.1.4), on peut essayer de tenir compte des effets électrostatiques dus aux charges portées par les ions (§II.3.2). Enfin, nous présenterons un calcul de S. Ramaswamy *et al.* [Ramaswamy *et al.*, 1999] qui tient compte du couplage entre la courbure de la membrane et le flux diffusif de centres actifs (§II.3.3).

II.3.1 Membrane polymérisée

Le cas d'une membrane polymérisée est particulièrement intéressant puisque l'exemple classique de membrane polymérisée est celle du globule rouge pour lequel existent beaucoup de données expérimentales. Comme nous l'avons vu au paragraphe §I.3.3.2, le spectre d'une membrane passive polymérisée est donné par :

$$\langle u(q_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4 + c' \sqrt{kT\mu} q_-^3 + \sigma q_-^2}.$$

Le terme en q_-^3 vient de l'énergie de cisaillement présente dans le hamiltonien \mathcal{H} pour une membrane polymérisée. Pour alléger la notation, nous poserons ici $c' \sqrt{kT\mu} \equiv \varpi$. Le taux de relaxation d'une membrane polymérisée passive libre est donc :

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_-} \right) (\sigma q_-^2 + \varpi q_-^3 + \kappa q_-^4), \quad (\text{II.3.1})$$

et en présence d'une paroi :

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{d^3 q_-^2}{12\eta} \right) (\sigma q_-^2 + \varpi q_-^3 + \kappa q_-^4), \quad (\text{II.3.2})$$

II.3.1.1 Membrane active polymérisée libre

L'équation de Langevin démontrée pour une membrane active libre (Eq. II.1.4) est vérifiée avec l'expression du temps de relaxation de la membrane donnée par l'équation II.3.1. Il suffit donc de remplacer cette nouvelle expression du temps de relaxation dans le spectre de fluctuations trouvé au paragraphe II.1.1 (Eq. II.1.6) pour obtenir le spectre de fluctuations d'une membrane active polymérisée libre.

Pour une membrane tendue, c'est toujours le terme de tension en q_-^2 qui domine aux grandes longueurs d'onde et le résultat obtenu au paragraphe II.1.1.3 (Eq. II.1.10) reste valable. En revanche, pour une membrane sans tension, dans la limite où $q_- \rightarrow 0$, le terme de cisaillement en q_-^3 domine le terme de courbure en q_-^4 . On trouve alors :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta^2\rho\lambda_p^2 F_a^2}{\varpi^2(1+\eta D/\varpi)q_-^4} + \frac{kT}{\varpi q_-^3}. \quad (\text{II.3.3})$$

Les arguments d'échelle permettent de confirmer ce résultat puisqu'on trouve, pour le bruit dû aux fluctuations de concentration :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho\lambda_p F_a^2}{\varpi D} \frac{L^3}{1+L/4\lambda_p\eta},$$

et, pour le bruit de 'shot' :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho\tau\lambda_p I_0}{\varpi} \frac{L}{1+L/4\lambda_p\eta}.$$

On retrouve donc, pour une membrane active polymérisée, la même loi de puissance en $1/q_-^4$ que pour une membrane passive non polymérisée. Les expériences sur les globules rouges montrent que le spectre de fluctuations se comporte effectivement en $1/q_-^4$, ce qui paraissait contradictoire si on ne tenait pas compte des effets hors équilibre (voir §I.3.3.2). En effet, ces expériences ont été le plus souvent analysées à l'aide de modèles de membrane à l'équilibre thermodynamique et sans tenir compte de la présence du cytosquelette. On voit ici que si on prend en compte le cytosquelette et les phénomènes hors équilibre, on rend parfaitement compte de la loi de puissance en $1/q_-^4$. Nous donnerons des ordres de grandeur au chapitre §II.4 et montrerons que le terme actif ci-dessus (Eq. II.3.3) est comparable au terme passif $kT/\kappa q_-^4$ (voir §II.4.2.3).

II.3.1.2 Membrane active polymérisée fluctuant près d'une paroi

Nous résumons ici les résultats obtenus à l'aide du modèle en loi d'échelle appliqué au cas d'une membrane active polymérisée fluctuant près d'une paroi. La démarche est complètement

identique à celle des paragraphes §§II.2.2 et II.2.3 : on calcule le spectre de fluctuations en présence d'une paroi, puis la longueur de collision et enfin la pression hors équilibre.

Le temps de réponse de la membrane d'une membrane polymérisée en présence d'une paroi est donné par l'équation II.3.2. On suppose que le terme dominant dans l'équation II.3.2 est le terme de cisaillement en q^3 . On va donc appliquer les arguments d'échelle avec :

$$\tau_m(L)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{d^3}{12\eta L^2} \right) \frac{\varpi}{L^3}.$$

- Dans le régime perméatif, le spectre de fluctuations, donné au paragraphe précédent, n'est pas modifié en présence de paroi, donc, pour les fluctuations de densité des centres actifs :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho \lambda_p F_a^2}{\varpi D} L^3,$$

et, pour le bruit de 'shot' :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho \tau \lambda_p I_0}{\varpi} L.$$

- Dans le régime hydrodynamique, on doit le recalculer et on trouve un effet d'amplification similaire à celui obtenu pour une membrane sans tension. Pour le bruit dû aux fluctuations de concentration, on a :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\varpi D} \frac{L^5}{d^3},$$

et, pour le bruit de 'shot' :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0}{\varpi} \frac{L^3}{d^3}.$$

Fluctuations de densité des centres actifs

On en déduit les longueurs de collision suivantes, dans le régime perméatif :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\varpi D}{\rho \lambda_p F_a^2} \right)^{1/3} d^{2/3},$$

et dans le régime hydrodynamique :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\varpi D}{\eta \rho \lambda_p^2 F_a^2} \right)^{1/5} d.$$

Puis en appliquant la loi d'échelle II.2.5, comme au paragraphe II.2.3.3, on en déduit la pression hors équilibre et son domaine de validité dans le régime perméatif :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\rho \lambda_p F_a^2}{D} \frac{1}{d},$$

si $d \ll \varpi D / \rho \lambda_p F_a^2$ et $d \ll (\lambda_p \eta^3 \varpi D)^{1/5} / \rho F_a^2)^{1/5}$.

Dans le régime hydrodynamique, on trouve aussi :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\rho \lambda_p F_a^2}{D} \frac{1}{d}.$$

Ce résultat est valable si $\varpi D \gg \eta \rho \lambda_p^2 F_a^2$ et si $d \gg (\lambda_p \eta) (\varpi D / \eta \rho \lambda_p^2 F_a^2)^{1/5}$.

Bruit de 'shot'

Dans le cas où la source de bruit dû aux fluctuations de l'activité des centres actifs domine, on trouve les longueurs de collision suivantes, dans le régime perméatif :

$$L_c(d) \propto \frac{\varpi}{\rho \tau \lambda_p I_0} d^2,$$

et dans le régime hydrodynamique :

$$L_c(d) \propto \left(\frac{\varpi D}{\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0} \right)^{1/3} d^{5/3}.$$

Enfin, on applique la loi d'échelle II.2.4, comme au paragraphe II.2.3.3, pour trouver la pression hors équilibre dans le régime perméatif :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{(\tau \rho I_0)^4}{\eta^{1/2} \varpi^3} \frac{1}{d^{11/2}},$$

valable si $d \gg \rho \tau \lambda_p I_0 / \varpi$ et si $d \gg (\rho \tau \lambda_p I_0)^2 / \lambda_p \eta \varpi^2$.

Dans le régime hydrodynamique, on obtient :

$$\langle P(d) \rangle \propto \frac{\eta^{2/3} \lambda_p^{7/3} (\tau \rho I_0)^{5/3}}{\varpi^{2/3}} \frac{1}{d^{13/3}}.$$

Le domaine de validité de ce résultat est donné par $d \ll (\rho \tau \lambda_p I_0)^2 / \lambda_p \eta \varpi^2$ et si $d \gg (\eta \rho \tau \lambda_p^2 I_0 / \varpi)^{1/2}$.

Conclusions

Dans le cas du bruit dû aux fluctuations de l'activité des centres actifs (bruit de 'shot'), la portée de la force exercée par la paroi sur une membrane active polymérisée est moins grande que celle subie par une membrane passive non polymérisée. En revanche, le bruit dû aux fluctuations de densité des centres actifs crée une pression en $1/d$ à très longue portée, comme dans le cas d'une membrane active non polymérisée sans tension (voir §II.2.3.4).

II.3.2 Effets électrostatiques

Dans ce paragraphe, nous présentons quelques idées de calculs permettant d'étudier l'influence des effets électrostatiques dans le cadre du modèle hydrodynamique du paragraphe II.1.1. Dans une première approche présentée au §II.3.2.1, on donne uniquement le principe du calcul. Dans la deuxième approche (§II.3.2.2), on citera le résultat obtenu sans détailler les calculs.

On tient compte ici de l'électrostatique en supposant que les centres actifs pompent une espèce chargée (par exemple des protons de charge $+q_e$) d'un côté à l'autre de la membrane. Nous supposerons donc qu'il apparaît une différence de concentration δc , une différence de pression

osmotique $\delta\Pi$ où $\Pi = kTc\mathcal{N}_a$ avec $\mathcal{N}_a = 6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, une différence de pression hydrodynamique δP et une différence de potentiel électrochimique $\delta\mu$ entre les deux côtés de la membrane. Le potentiel électrochimique est $\mu = q_e\phi + kT \ln c$, où ϕ est le potentiel électrique. Dans le modèle simple considéré ici, on négligera le rôle des contre-ions et on supposera que l'électroneutralité n'est pas localement vérifiée de sorte qu'il apparaisse une densité nette de charges en solution $\varrho = q_e\mathcal{N}_a c$ et un champ électrique $\mathbf{E} = -\nabla\phi$.

II.3.2.1 Equations hydrodynamiques

Une première approche, analogue à celle du paragraphe II.1.1.1, suppose que l'on connaît le coefficient de perméation λ_p *a priori* et permet d'aboutir à l'équation de Langevin à partir des équations hydrodynamiques vérifiées par le fluide, le déplacement de la membrane et la concentration des ions. Les variables sont donc ici la vitesse du fluide \mathbf{v} , la pression hydrodynamique P et la pression osmotique Π , le déplacement de la membrane u , la concentration des ions c et le potentiel électrique ϕ . On se contente ici de donner les équations et les conditions aux limites, sans résoudre complètement le problème.

Le fluide incompressible vérifie les équations linéarisées suivantes :

$$\begin{aligned} \eta\nabla^2\mathbf{v}(\mathbf{r},t) - \nabla P(\mathbf{r},t) - \frac{\delta\mathcal{H}}{\delta u(\mathbf{r},t)}\delta(z)\mathbf{k} - q_e\mathcal{N}_a c\nabla\phi - \mathbf{f}_h(\mathbf{r},t) &= 0 \\ \nabla.\mathbf{v}(\mathbf{r},t) &= 0 \\ \frac{\partial u(\mathbf{r}_-,t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_-, z=0, t) &= \lambda_p[\delta P(\mathbf{r}_-, t) - \delta\Pi(\mathbf{r}_-, t) + f_{th}(\mathbf{r}_-, t) + f_a(\mathbf{r}_-, t)]. \end{aligned}$$

La concentration des ions c suit une loi de diffusion $dc/dt + \nabla\mathbf{J} = 0$, où le flux est donné par :

$$\mathbf{J} = -D\nabla c - D\frac{c}{kT/q_e}\nabla\phi.$$

On en déduit :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \mathbf{v}.\nabla c = D\nabla^2 c + D\frac{c}{kT/q_e}\nabla^2\phi + \frac{D}{kT/q_e}\nabla c.\nabla\phi. \quad (\text{II.3.4})$$

Enfin, le potentiel électrique ϕ obéit à la loi de Poisson :

$$\nabla^2\phi = -\lambda_D^{-2}\frac{kT}{q_e}\frac{c}{\bar{c}}, \quad (\text{II.3.5})$$

où $\lambda_D = (\epsilon\epsilon_0 kT/q_e^2 \mathcal{N}_a c)^{1/2}$ est la longueur de Debye (voir §I.3.1.6) et \bar{c} est la concentration ionique moyenne de la solution.

Ces équations peuvent être linéarisées en négligeant les termes d'ordre supérieur dans l'équation de diffusion des ions. Nous n'avons pas résolu ces équations, mais en utilisant une démarche complètement analogue à celle des paragraphes §§I.1.3.1 et II.1.1.2, on doit en principe aboutir, après transformation de Fourier, à l'équation de Langevin vérifiée par le déplacement u de la membrane en présence de charges en solution et à l'expression du temps de relaxation de la membrane $\tau_m(\mathbf{q}_-)$.

II.3.2.2 Coefficients de transport

La deuxième approche consiste à reprendre le calcul effectué dans le cas particulier des canaux ioniques (voir §II.1.1.4) [Prost and Bruinsma, 1996] pour exprimer le coefficient de perméation λ_p en fonction des coefficients de transport Λ_{ij} .

Comme précédemment, mais en ne considérant que le passage d'une seule espèce chargée $+q_e$ à travers la membrane, le flux d'eau J_j et le flux de protons I_j à travers le j ème canal sont donnés par :

$$\begin{aligned} J_j &= \Lambda_{11}(\delta P_j - \delta\Pi_j) + \Lambda_{12}(\delta\mu_j) \\ I_j &= \Lambda_{21}(\delta P_j - \delta\Pi_j) + \Lambda_{22}(\delta\mu_j), \end{aligned}$$

Les équations vérifiées par le fluide (voir §II.1.1.4) sont ici :

$$\begin{aligned} \eta\nabla^2\mathbf{v}(\mathbf{r},t) &= \nabla P(\mathbf{r},t) + q_e\mathcal{N}_a c\nabla\phi \\ \nabla.\mathbf{v}(\mathbf{r},t) &= 0. \end{aligned}$$

La concentration ionique c et le potentiel électrique vérifient toujours respectivement la loi de diffusion (Eq. II.3.4) et la loi de Poisson (Eq. II.3.5).

On peut alors suivre la même démarche qu'au paragraphe §II.1.1.4 pour trouver l'équation de Langevin et les expressions du coefficient de perméation λ_p et du flux F , représentant l'amplitude du bruit hors équilibre, en fonction des paramètres de transport. Sans détailler les calculs, on trouve :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + (\kappa q^4 + \sigma q^2) \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_-} \right) u(\mathbf{q}_-, t) = F_{th}(\mathbf{q}_-, t) + F \sum_j S_j(t) \exp(i\mathbf{q}_-. \mathbf{R}_j(t)),$$

avec

$$F = \frac{\frac{\bar{J}}{\langle\zeta\rangle}(\bar{c}\Lambda_{11} - \Lambda_{12}) - K(\bar{c}\Lambda_{21} - \Lambda_{22}) - \frac{\bar{J}'}{kT\langle\zeta\rangle}}{\Lambda_{22} - 2\bar{c}\Lambda_{21} + \bar{c}^2\Lambda_{11} + \frac{\bar{J}'}{kT\langle\zeta\rangle}},$$

et

$$\lambda_p = \langle\zeta\rangle \frac{\Lambda_{11} \frac{\bar{J}'}{kT\langle\zeta\rangle} + \Lambda_{11}\Lambda_{22} - 2\Lambda_{12}^2}{\Lambda_{22} - 2\bar{c}\Lambda_{21} + \bar{c}^2\Lambda_{11} + \frac{\bar{J}'}{kT\langle\zeta\rangle}},$$

où $\bar{J} = \langle\zeta\rangle(\Lambda_{21}\Delta P + (\Lambda_{22}/\bar{c} - \Lambda_{21})kT\Delta c + \Lambda_{22}q_e\Delta\phi)$ est le flux moyen d'ions à travers les canaux, $\bar{J}' = \bar{J}/(1 + \lambda_D^{-2}/q^2)$ et $K = \Lambda_{11}\Delta P + (\Lambda_{12}/\bar{c} - \Lambda_{11})kT\Delta c + \Lambda_{12}q_e\Delta\phi$. On rappelle que $\langle\zeta\rangle = p\mu$, où p est la probabilité d'ouverture des canaux. A la limite où les interactions électrostatiques sont fortement écrantées, on a $\lambda_D \rightarrow \infty$ et on retrouve bien les résultats du paragraphe II.1.1.4.

II.3.3 Couplage courbure-diffusion

Nous avons supposé que la force hors équilibre s'exerce par l'intermédiaire de centres actifs incorporés dans la membrane et que ces inclusions membranaires, par exemple des protéines,

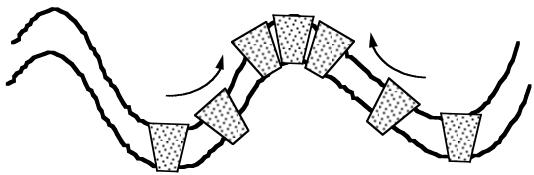


FIG. II.3.1: Couplage entre les flux diffusifs de centres actifs et la courbure de la membrane : les protéines s'accumulent dans les zones où la courbure est ‘adaptée’ à leur asymétrie.

diffusent dans la membrane. Si la forme géométrique des centres actifs n'est pas symétrique, ils vont diffuser vers des régions de la membrane où la courbure est ‘adaptée’ à leur asymétrie (voir Fig. II.3.1). Le flux de centres actifs sera donc couplé aux gradients de courbure de la membrane. Dans la suite, nous présentons rapidement un calcul de S. Ramaswamy, J. Toner et J. Prost [Ramaswamy et al., 1999] où les auteurs ont tenu compte de cet effet en incluant dans le calcul un terme de couplage avec la courbure, négligé dans les modèles précédents, puis en reprenant le calcul complètement à partir des équations hydrodynamiques de base. Le modèle présenté ci-dessous est donc plus général que les précédents, même si la compressibilité de la membrane n'est pas prise en compte.

II.3.3.1 Equations dynamiques

On rend compte du couplage entre la courbure de la membrane $\nabla_-^2 u$ et la densité des centres actifs par un terme supplémentaire dans l'énergie libre de la membrane proportionnel à $\rho \nabla_-^2 u$:

$$\mathcal{H} = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 - \Xi \rho \nabla_-^2 u \right] d^2 \mathbf{r}_-. \quad (\text{II.3.6})$$

Le coefficient de couplage est noté Ξ .

Le potentiel chimique μ des centres actifs est alors donné par :

$$\mu = kT \ln \frac{\rho}{\bar{\rho}} - \Xi \nabla_-^2 u,$$

où $\bar{\rho}$ est la densité moyenne de centres actifs. On en déduit le flux de centres actifs \mathbf{J} :

$$\mathbf{J} = -\Lambda \nabla_- \mu = -\Lambda \nabla_- \left(kT \ln \frac{\rho}{\bar{\rho}} - \Xi \nabla_-^2 u \right),$$

où $\Lambda = \bar{\rho} D / kT$.

L'équation de conservation vérifiée par la densité de centres actifs ρ s'écrit :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla_- \cdot \mathbf{J} = f_\rho, \quad (\text{II.3.7})$$

où f_ρ est le bruit thermique.

On peut, comme précédemment, passer dans l'espace réciproque pour trouver l'équation de Langevin vérifiée par le déplacement u de la membrane. La présence dans le hamiltonien (Eq. II.3.6) du terme de couplage entre la courbure de la membrane et la densité des centres actifs entraîne l'apparition d'un nouveau terme dans cette équation de Langevin :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} u(\mathbf{q}_-, t) = \lambda_p [f_{th}(\mathbf{q}_-, t) + \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \mathbf{k}}{q^2} dq_z - \Xi q_-^2 \rho(\mathbf{q}_-, t) (1 + 1/4\eta\lambda_p q_-)], \quad (\text{II.3.8})$$

où

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

II.3.3.2 Cas d'une membrane passive

Le cas d'inclusions dans une membrane passive a été décrit au paragraphe §I.3.2.2. Nous pouvons retrouver ici facilement la renormalisation du module de courbure κ d'une membrane passive en présence d'inclusions. En effet, si on se place dans le cas statique où le flux de centres actifs est nul, on trouve que la densité peut s'exprimer en fonction du déplacement de la membrane par :

$$\rho(\mathbf{q}_-, t) = -\bar{\rho} \frac{\Xi}{kT} q_-^2 u(\mathbf{q}_-, t).$$

Donc le terme d'énergie associé au couplage entre la courbure et la diffusion se comporte en $q_-^4 u^2$ comme le terme de courbure :

$$-\Xi \rho \nabla_-^2 u = -\bar{\rho} \frac{\Xi^2}{kT} q_-^4 u(\mathbf{q}_-, t)^2.$$

L'effet du couplage est une simple renormalisation de κ :

$$\kappa_{eff} = \kappa \left(1 - \frac{\bar{\rho} \Xi^2}{\kappa kT} \right). \quad (\text{II.3.9})$$

Cela peut être vérifié par un calcul complet à partir des équations dynamiques du paragraphe §II.3.3.1 [Ramaswamy et al., 1999]. Les équations II.3.7 et II.3.8 forment, après transformaton de Fourier sur le temps et l'espace, un système de deux équations vérifiées par $u(\mathbf{q}_-, t)$ et $\rho(\mathbf{q}_-, t)$ que l'on peut résoudre en fonction des bruits thermiques f_{th} et f_ρ . Les fonctions de corrélation du bruit thermique f_{th} sont données par les équations I.1.23 :

$$\begin{aligned} \langle f_{th}(\mathbf{r}_-, t) \rangle &= 0 \\ \langle f_{th}(\mathbf{r}_-, t) f_{th}(\mathbf{r}'_-, t') \rangle &= 2 \frac{kT}{\lambda_p} \delta(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}'_-) \delta(t - t') \end{aligned}$$

Les fonctions de corrélations de f_ρ sont données par :

$$\begin{aligned} \langle f_\rho(\mathbf{r}_-, t) \rangle &= 0 \\ \langle f_\rho(\mathbf{r}_-, t) f_{th}(\mathbf{r}'_-, t') \rangle &= -2kT \Lambda \nabla_-^2 \delta(\mathbf{r}_- - \mathbf{r}'_-) \delta(t - t') \end{aligned}$$

On peut, à partir de ces fonctions de corrélation, en déduire $\langle u(\mathbf{q}_-, \omega)u(\mathbf{q}'_-, \omega') \rangle$ et $\langle \rho(\mathbf{q}_-, \omega)\rho(\mathbf{q}'_-, \omega') \rangle$. Un calcul des pôles puis une intégration dans le plan complexe donne ensuite : $\langle u(\mathbf{q}_-, t)u(\mathbf{q}'_-, t') \rangle$ et $\langle \rho(\mathbf{q}_-, t)\rho(\mathbf{q}'_-, t') \rangle$. On peut vérifier que l'on obtient les spectres attendus pour une membrane passive où les fluctuations de densité des inclusions sont couplées à la courbure de la membrane [Ramaswamy et al., 1999] :

$$\langle \rho(\mathbf{q}_-, t)\rho(-\mathbf{q}_-, t) \rangle = \bar{\rho} \frac{1}{1 - (\bar{\rho}\Xi^2/kT)q_-^4}/(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4),$$

et

$$\langle u(\mathbf{q}_-, t)u(-\mathbf{q}_-, t) \rangle = \frac{kT}{\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4 - (\bar{\rho}\Xi^2/kT)q_-^4}.$$

II.3.3.3 Cas d'une membrane active

On ne s'intéresse ici qu'au bruit hors équilibre dû aux fluctuations de densité de centres actifs. Pour en tenir compte, on ajoute le terme ρF_a dans l'équation de Langevin II.3.8 :

$$\begin{aligned} \frac{\partial u(\mathbf{q}_-, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1}u(\mathbf{q}_-, t) &= \lambda_p[f_{th}(\mathbf{q}_-, t) + \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \mathbf{k}}{q^2} dq_z] \\ &\quad - \Xi q_-^2 \rho(\mathbf{q}_-, t)(1 + 1/4\eta\lambda_p q_-) + \rho(\mathbf{q}_-, t)F_a], \end{aligned} \quad (\text{II.3.10})$$

Un calcul similaire à celui résumé au paragraphe précédent permet de trouver le spectre de fluctuations $\langle u(\mathbf{q}_-, t)u(\mathbf{q}'_-, t') \rangle$ à partir des équations dynamiques II.3.7 et II.3.10. Le résultat complet est :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle &= \frac{\lambda_p^2 F_a^2 k T \Lambda q_-^2}{[D q_-^2 + (\lambda_p + 1/4\eta q_-)(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4)] [D q_-^2 (\lambda_p + 1/4\eta q_-)(\sigma q_-^2 + \kappa q_-^4) + \lambda_p F_a \Lambda \Xi q_-^4]} \\ &\quad + \frac{kT}{\kappa_{eff} q_-^4 + \sigma q_-^2}. \end{aligned}$$

Pour une membrane tendue ($\sigma \neq 0$), dans la limite $\mathbf{q}_- \rightarrow 0$, on retrouve le spectre de fluctuations obtenu en négligeant le couplage entre la courbure et la diffusion (voir §II.1.1.3, Eq. II.1.10, p. 98) :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta^2 \lambda_p^2 F_a^2 k T \Lambda}{D \sigma^2 q_-^2} + \frac{kT}{\sigma q_-^2} = \frac{16\eta^2 \bar{\rho} \lambda_p^2 F_a^2}{\sigma^2 q_-^2} + \frac{kT}{\sigma q_-^2}. \quad (\text{II.3.11})$$

Dans le cas d'une membrane sans tension ($\sigma = 0$), dans le régime hydrodynamique, c'est-à-dire si $q_- \ll \lambda_p \eta$, on trouve :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{\lambda_p^2 F_a^2 k T \Lambda}{(D + \kappa q_-/4\eta)(D \kappa q_-^5/4\eta + \lambda_p F_a \Lambda \Xi q_-^4)} + \frac{kT}{\kappa_{eff} q_-^4},$$

ce qui peut se réécrire comme :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4} \frac{\kappa \lambda_p F_a / \Xi D}{(1 + q_-/q_{c1})(1 + q_-/q_{c2})} + \frac{kT}{\kappa_{eff} q_-^4}, \quad (\text{II.3.12})$$

avec $q_{c1} = 4\eta D/\kappa$ et $q_{c2} = (4\eta \lambda_p F_a \Lambda \Xi)/(D\kappa)$. La seule dépendance en $\bar{\rho}$, densité moyenne des centres actifs, se trouve dans l'expression de q_{c2} , puisque $\Lambda = \bar{\rho}D/kT$. Dans la limite $q_- \rightarrow 0$, c'est-à-dire si $q_- \ll q_{c1}$ et $q_- \ll q_{c2}$, et en supposant $\kappa_{eff} \simeq \kappa$, on trouve :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT_{eff}}{\kappa q_-^4},$$

où $T_{eff}/T = 1 + \kappa \lambda_p F_a / \Xi D$. Dans ce régime particulier, l'effet de l'activité des centres actifs est alors indépendant de la densité de centres actifs et consiste en une simple renormalisation de la température.

Chapitre II.4

Quelques ordres de grandeur et conséquences

II.4.1 Paramètres des modèles théoriques

Pour pouvoir comparer les effets du bruit hors équilibre par rapport à ceux du bruit thermique sur les fluctuations de forme d'une membrane, il est nécessaire de connaître les valeurs des paramètres qui interviennent dans les différents modèles théoriques décrits plus haut. Les hypothèses simplificatrices utilisées pour décrire l'activité des centres actifs sont suffisamment générales pour pouvoir s'appliquer à plusieurs situations expérimentales.

II.4.1.1 Grandeurs caractéristiques d'une bicouche lipidique

On prendra, comme à la partie I, $\kappa = 10 kT = 4 \times 10^{-20} \text{ J}$ pour le module de courbure et $\sigma = 10^{-6} \text{ N/m}$ comme valeur typique de la tension. Les paramètres dynamiques η et λ_p interviennent dans les équations hydrodynamiques. La viscosité η du solvant est proche de celle de l'eau : $\eta \simeq \eta_{\text{eau}} = 10^{-3} \text{ kg/m.s}$. La viscosité associée au cisaillement de la membrane est de l'ordre de $\eta_{mb-cis} \simeq 100\eta$, alors que la viscosité associée à la compression d'une bicouche lipidique est typiquement $\eta_{mb-comp} \simeq 10^5\eta$.

Le coefficient de perméation λ_p (en $\text{m}^3/\text{N.s}$) d'une bicouche lipidique intervient dans la loi de Darcy comme constante de proportionnalité entre le débit de solvant Φ (en m^3/s) qui traverse la membrane et la force F qui permet le passage de solvant (voir Eq. I.1.19, p. 21) :

$$\Phi = \lambda_p F.$$

En général, le coefficient de transport mesuré expérimentalement est le coefficient de perméabilité, Λ_p (en m/s), défini par :

$$V = \Lambda_p v_{\text{eau}} \Delta c,$$

où $v_{\text{eau}} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ est le volume molaire de l'eau, Δc est la différence de concentration du soluté et V est la vitesse du flux à travers la membrane. Par des expériences de choc osmotique sur des vésicules lipidiques, on trouve typiquement $\Lambda_p = 40 \times 10^{-6} \text{ m/s}$ pour le passage d'eau à travers une membrane d'EPC [Boroske et al., 1981, Jansen, 1994, Bernard, 1999]. Dans le cas d'un choc osmotique, la force osmotique qui permet le passage de l'eau est donnée par $F = S \times \Delta\Pi$ où $\Delta\Pi = \Delta c RT$ est la différence de pression osmotique, S est la surface de membrane considérée et $R = 8.31 \text{ J}^\circ \text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Avec $\Phi = VS$, on peut en déduire la relation entre Λ_p et λ_p :

$$\lambda_p = \Lambda_p \frac{v_{\text{eau}}}{RT}.$$

On obtient alors typiquement $\lambda_p \simeq 10^{-13} - 10^{-12} \text{ m}^3/\text{N.s}$ pour une bicouche lipidique.

II.4.1.2 Grandeurs caractéristiques des centres actifs

De manière très générale, les centres actifs sont caractérisés par la force moyenne qu'ils exercent sur la membrane F_a , leur coefficient de diffusion D , leur densité ρ , le temps d'autocorrélation τ et l'amplitude de la fonction d'autocorrélation I_0 . Le coefficient de diffusion d'inclusions dans une bicouche lipidique est typiquement $D \simeq 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Si on suppose que les centres actifs sont distants les uns des autres d'environ 10 nm, on obtient une densité $\rho \simeq 10^{16} \text{ m}^{-2}$. Le temps d'autocorrélation de l'activité des centres actifs τ peut être assimilé à la durée pendant laquelle la force s'exerce et dépend donc du type de centres actifs considérés (voir ci-dessous et §III.1.5).

Nous avons vu qu'en général l'effet de l'activité hors équilibre est dominé par le terme de fluctuations de concentration, et que le terme dû aux fluctuations de l'activité des centres actifs joue un rôle secondaire. Nous nous intéresserons donc principalement au terme de fluctuations de concentration des centres actifs. Dans toutes les expressions obtenues précédemment, c'est toujours le produit $\Phi = \lambda_p F_a$ (en m^3/s) qui caractérise l'effet des fluctuations de concentration des centres actifs. Ce paramètre Φ est particulièrement difficile à estimer dans le cas d'une membrane active puisque la force F_a n'est pas connue *a priori* et que la présence des centres actifs peut modifier notablement la valeur du coefficient de perméation λ_p . Φ représente le flux de solvant transporté à travers la membrane par un centre actif. Si on suppose très grossièrement qu'un volume e^3 , où e est l'épaisseur de la membrane, peut être transporté par un centre actif en 1 ms, on obtient $\Phi \simeq 10^{-22} \text{ m}^3/\text{s}$. Nous allons voir ci-dessous qu'on peut obtenir une estimation de Φ dans le cas particulier des canaux ioniques.

II.4.2 Membrane libre

II.4.2.1 Cas particulier des canaux ioniques

Effet de l'activité

A partir du modèle développé pour les canaux ioniques au paragraphe §II.1.1.4, on peut estimer le produit $\Phi = \lambda_p F_a$ et l'effet de l'activité hors équilibre. Les paramètres Λ_{ij} qui interviennent dans les équations phénoménologiques de transport (Eqs. II.1.12 et II.1.13) peuvent être calculés à partir de grandeurs mesurables [Prost and Bruinsma, 1996].

- Le coefficient Λ_{11} représente la perméabilité d'un canal et se déduit du coefficient de perméation de la membrane λ_p par : $\Lambda_{11} = \lambda_p / \rho \simeq 10^{-28} \text{ m}^5/\text{N.s}$.
- Le coefficient Λ_{22} correspond à la conductivité G du canal : $\Lambda_{22} = G/q_e^2$. Typiquement, le courant mis en jeu lors du passage des ions est de l'ordre de 3 pA et la différence de potentiel est environ 100 mV. On en déduit $G \simeq 10^{-11} \text{ S}$, soit $\Lambda_{22} \simeq 10^{27} \text{ 1/N.m.s}$.
- Le coefficient Λ_{12} est donné par $\Lambda_{12} = N v_{eau} G / q_e^2$, où $v_{eau} = 3 \times 10^{-29} \text{ m}^3$ est le volume d'une molécule d'eau et $N \simeq 5 - 10$ est le nombre de molécules d'eau qui accompagnent chaque ion lors de son passage à travers le canal. On en déduit : $\Lambda_{12} \simeq 0.2 \text{ m}^2/\text{N.s}$.

En utilisant les valeurs des paramètres Λ_{ij} ci-dessus et en supposant $\Delta P/kT \simeq \Delta c \simeq \bar{c} \simeq 100 \text{ mM}$ (voir Tab. I.2.3, §I.2.3.1), on trouve que l'amplitude du bruit hors équilibre, c'est-à-dire le flux Φ , est donnée par l'équation II.1.14 :

$$\Phi \simeq kT \frac{\Lambda_{22}}{\bar{c}} \left(\frac{\Delta c}{\bar{c}} \right)^2,$$

soit $\Phi \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$. On peut déduire de la même façon le coefficient de perméation λ_p donné par l'équation II.1.15 :

$$\lambda_p \simeq \rho \frac{\Lambda_{22}}{2\bar{c}^2}.$$

On trouve une valeur bien plus grande que dans le cas d'une bicouche lipidique : $\lambda_p \simeq 3 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{N.s}$.

La longueur caractéristique de l'activité ξ_a est donnée par $\xi_a = kTD/16\eta\rho\Phi^2$ (voir §II.1.1.4). Avec la valeur de Φ obtenue ci-dessus, on trouve $\xi_a \simeq 5 \text{ nm}$. La contribution active domine le spectre de fluctuations si $q_- \ll \xi_a^{-1}$, c'est-à-dire si la longueur d'onde des fluctuations est grande devant ξ_a (voir Eq. II.1.8). Pour une membrane de taille $L \simeq 10 \mu\text{m}$, la longueur d'onde λ des fluctuations est limitée par $a < \lambda < L$, où $a = 0.5 \text{ nm}$ est le 'cut-off' moléculaire. On aura donc en général $\lambda \gg \xi_a$, et on s'attend alors à ce que le terme actif domine le spectre de fluctuations.

Estimation de la force exercée par un canal

Nous avons déjà donné, à la fin de la première partie, un ordre de grandeur de la force exercée par un centre actif $F_a \simeq kT/e \simeq 10^{-12} \text{ N}$, où $e = 5 \text{ nm}$ est l'épaisseur de la membrane.

Dans le cas particulier d'un canal ionique, on peut aussi estimer cette force par des arguments hydrodynamiques. Pour un canal typique, un flux d'environ 5000 ions traverse le canal pendant la durée d'ouverture du canal $\tau = 1 \text{ ms}$ (voir §II.1.1.4). Un ion donné met donc en moyenne un temps $\tau/5000$ pour traverser. La vitesse d'un ion lors de son passage à travers la membrane est donc $v_{ion} = 5000e/\tau \simeq 25 \text{ mm/s}$. Une estimation de la force de friction exercée par le passage des ions est donnée par la force de Stokes : $F_a = 6\pi R_{ion} \eta_{mb} v_{ion}$, où $R_{ion} \simeq 10^{-10} \text{ m}$ est le rayon de l'ion et η_{mb} est la viscosité de la membrane. En utilisant la viscosité de compression, qui semble plus appropriée dans le cas du passage d'ions à travers une membrane, on trouve une force bien plus grande que celle obtenue par l'estimation $F_a = kT/e$: $F_a \simeq 5 \times 10^{-9} \text{ N}$.

A partir de la valeur du flux $\Phi = \lambda_p F_a \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$ et de la valeur de $\lambda_p \simeq 3 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{N.s}$, on peut déduire une estimation de la force $F_a \simeq 2 \times 10^{-11} \text{ N}$ plus proche de l'estimation $F_a = kT/e$...

On voit, sur l'exemple des canaux ioniques pour lesquels on connaît pourtant relativement bien les paramètres microscopiques, qu'il est difficile d'estimer précisément les différents coefficients macroscopiques qui interviennent dans le modèle. En particulier, les valeurs de la perméation λ_p en présence de centres actifs et de la force F_a exercée par un centre actif semblent varier sur plusieurs ordres de grandeur selon les estimations. En conséquence, nous utiliserons dans la suite de ce paragraphe le produit $\Phi = \lambda_p F_a$ pour caractériser l'activité des centres actifs. En nous appuyant sur l'exemple des canaux ioniques, nous prendrons $\Phi \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$.

II.4.2.2 Cas général d'une membrane tendue ou sans tension

Nous utilisons ici les résultats du modèle général de membrane active libre décrit au paragraphe §II.1, donnés de façon équivalente par le modèle hydrodynamique (§II.1.1) ou par le modèle en loi d'échelle (§II.1.2).

Membrane sans tension

L'équation II.1.7 permet de définir la longueur ξ_a caractéristique de l'activité des centres actifs dans la limite des grandes longueurs d'onde pour une membrane sans tension :

$$\xi_a = \frac{kTD}{16\eta\rho\Phi^2}.$$

Avec $\Phi = \lambda_p F_a \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$, on obtient bien entendu le même résultat qu'au paragraphe précédent soit : $\xi_a \simeq 5 \text{ nm}$.

La longueur de persistance ξ_p d'une membrane active est définie par l'équation II.1.9 :

$$\ln(\xi_p/a) + r(\xi_p/\xi_a) = \frac{4\pi\kappa}{kT},$$

où r est une constante numérique. En négligeant le terme logarithmique, on trouve $\xi_p \simeq \xi_a(4\pi\kappa/kT) \simeq 1 \mu\text{m}$. L'effet de l'activité se traduit par une très forte diminution de

la longueur de persistance de la membrane, puisque pour une membrane passive, $\xi_p = a \exp(2\pi\kappa/kT) \simeq 10^{18} \text{ m}$ (voir §I.1.2.2).

Membrane tendue

Pour une membrane sous tension, on peut estimer l'effet de l'activité à l'aide de l'équation II.1.10. Dans ce cas, l'activité des centres actifs se traduit par une renormalisation de la température en $T_{eff} = T + T_{act}$ où :

$$\frac{T_{act}}{T} = \frac{16\eta^2\rho\Phi^2}{kT\sigma}.$$

Avec les données précédentes, on trouve : $T_{act}/T \simeq 0.2$. On s'attend à ce que l'activité hors équilibre produise là encore un effet non négligeable.

II.4.2.3 Cas particulier du globule rouge

Le cas du globule rouge présente l'avantage d'avoir été étudié expérimentalement en détail (voir §I.3.3.2). Le module de cisaillement a été mesuré : $\mu = 10^{-5} \text{ J.m}^{-2}$ (voir §I.3.3.2).

Le spectre de fluctuations d'une membrane polymérisée libre sans tension est donné par l'équation II.3.3 :

$$\langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2 = \frac{16\eta^2\rho\Phi^2}{\varpi^2(1 + \eta D/\varpi)q_-^4} + \frac{kT}{\varpi q_-^3},$$

où $\Phi = \lambda_p F_a$ et où le coefficient ϖ se déduit du module de cisaillement μ par $\varpi = c'\sqrt{kT\mu} \simeq 5 \times 10^{-13} \text{ J/m}$.

On peut simplifier le terme actif puisque $\eta D/\varpi \ll 1$:

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2 &= \frac{16\eta^2\rho\Phi^2}{\varpi^2q_-^4} + \frac{kT}{\varpi q_-^3} \\ &= \frac{kT}{\varpi q_-^3} \left(1 + \frac{\xi_a^{-1}}{q_-} \right), \end{aligned}$$

où

$$\xi_a = \frac{\varpi kT}{16\eta^2\rho\Phi^2}.$$

Les ordres de grandeurs précédents permettent d'estimer $\xi_a \simeq 2.5 \mu\text{m}$. En se plaçant dans les conditions telles que $q_- \ll \xi_a^{-1}$, on peut s'attendre à ce que le terme hors équilibre domine le spectre de fluctuations.

Pour finir, on peut comparer le terme en $1/q_-^4$ trouvé ici dans le cas d'une membrane active polymérisée sans tension au terme en $1/q_-^4$ d'une membrane passive sans tension :

$$\frac{16\eta^2\rho\Phi^2}{\varpi^2q_-^4} \leftrightarrow \frac{kT}{\kappa q_-^4}.$$

Pour une membrane active polymérisée, on trouve : $16\eta^2\rho\Phi^2/\varpi^2 \simeq 10^{-3} \text{ m}^{-4}$. Pour une membrane passive non polymérisée, on obtient : $kT/\kappa \simeq 2 \times 10^{-1} - 6 \times 10^{-3} \text{ m}^{-4}$, selon la valeur choisie pour κ (voir §I.3.3.2). On constate donc qu'il est très difficile de distinguer le spectre de fluctuations d'une membrane active polymérisée de celui d'une membrane passive non polymérisée puisque les lois de puissance sont en $1/q_-^4$ dans les deux cas et que les préfacteurs sont du même ordre de grandeur. Cela pourrait expliquer pourquoi les données expérimentales sont bien reproduites par des modèles à l'équilibre thermodynamique où le couplage avec le cytosquelette n'est pas pris en compte.

II.4.3 Membrane en présence d'une paroi

Dans le cas d'une membrane fluctuant à proximité d'une paroi, il est difficile de donner des estimations précises car les résultats ont été obtenus par des arguments de loi d'échelle où les préfacteurs ne sont pas pris en compte. De plus, les résultats du modèle prévoient de nombreux régimes différents pour le comportement force répulsive hors équilibre. La distance d séparant la membrane de la paroi intervient et n'est pas facile à contrôler dans les expériences. Il faut aussi être capable de comparer la force hors équilibre aux autres interactions présentes entre la membrane et la paroi.

Nous choisirons comme exemple le cas d'une membrane tendue dans le régime hydrodynamique et soumise uniquement au bruit dû aux fluctuations de densité des centres actifs, puisque l'on a vu que l'effet le plus spectaculaire de l'activité hors équilibre est obtenu pour une membrane tendue (voir §II.2.3.4). On peut comparer la pression répulsive hors équilibre $\langle P(d) \rangle$ obtenue au paragraphe §II.2.3.3 à la force de van der Waals par unité de surface $F_{vdW} \propto A_H/d^3$, où $A_H \simeq kT$ est la constante de Hamaker. La pression hors équilibre vaut :

$$\langle P(d) \rangle \propto \left(\frac{\eta\rho^2\lambda_p F_a^4}{\sigma} \right)^{1/3} \frac{1}{d^{4/3}}.$$

La pression hors équilibre domine la force de van der Waals par unité de surface $\langle P(d) \rangle > F_{vdW}$ si

$$d > \left(\frac{\sigma(A_H)^3}{\eta\rho^2\lambda_p F_a^4} \right)^{1/5} = \left(\frac{\sigma(A_H)^3\lambda_p^3}{\eta\rho^2\Phi^4} \right)^{1/5}.$$

En utilisant $\Phi = \lambda_p F_a \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$ et $\lambda_p \simeq 3 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{N.s}$ pour un canal ionique, on trouve $d > 1 \text{ nm}$. On aura en général toujours une distance de séparation entre la membrane et la paroi grande devant l'épaisseur e de la membrane, donc la force hors équilibre devrait dominer la force de van der Waals. La condition de validité pour l'expression de $\langle P(d) \rangle$ utilisée ci-dessus est : $d \gg (\eta\lambda_p^3\sigma^2)/(\rho\Phi^2)$. La force hors équilibre dominera celle de van der Waals si $d \simeq e \gg (\eta\lambda_p^3\sigma^2)/(\rho\Phi^2)$, c'est-à-dire pour des tensions telles que $\sigma < 10^{-1} \text{ N/m}$, ce qui en pratique sera toujours le cas.

Cet exemple montre bien que la force hors équilibre exercée par une paroi sur une membrane active n'est pas une interaction négligeable et joue un rôle dans l'équilibre mécanique de la mem-

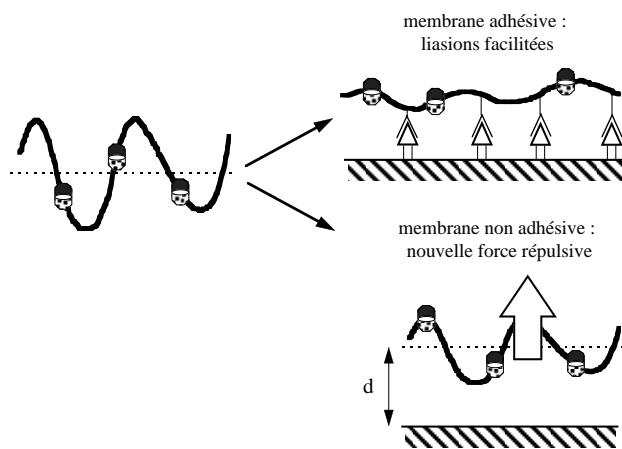


FIG. II.4.1: Effet de la pression hors équilibre sur les interactions entre deux membranes adhésives ou deux membranes non adhésives.

brane. Cela montre aussi que le phénomène d'amplification des fluctuations en présence d'une paroi doit avoir des conséquences expérimentales, notamment dans le cas où deux membranes fluctuent à proximité l'une de l'autre. Nous allons examiner ci-dessous qualitativement l'effet de l'activité hors équilibre sur les interactions de deux membranes adhésives ou non.

II.4.3.1 Membranes non adhésives

Dans le cas où il n'existe pas d'interactions attractives à courte portée entre les membranes, nous parlerons de membranes non adhésives. Le phénomène d'amplification des fluctuations prévu pour une membrane en présence d'une paroi intervient aussi dans le cas où deux membranes fluctuent l'une en face de l'autre. L'amplitude des fluctuations de chaque membrane augmente, comme si les membranes cherchaient à s'approcher le plus possible l'une de l'autre. Il en résulte une force hors équilibre répulsive qui les maintient écartées (voir Fig. II.4.1). La portée de la force répulsive hors équilibre étant en général supérieure à celle de la force d'équilibre correspondante, deux membranes actives commencent à interagir à des distances beaucoup plus grandes que dans le cas de membranes passives. Les interactions entre membranes sont donc fortement répulsives dans le cas de membranes non adhésives.

II.4.3.2 Membranes adhésives

Le cas de membranes adhésives, pour lesquelles il existe des interactions attractives à courte portée, est plus intéressant d'un point de vue expérimental. Les membranes cellulaires, par

exemple, contiennent de nombreuses molécules d'adhérence (voir §I.2.3.3) qui permettent un contact étroit entre la membrane et la matrice extracellulaire, ou bien entre les membranes de deux cellules différentes.

Si une membrane active contient des molécules d'adhérence, le phénomène d'amplification des fluctuations favorise la formation des liens adhésifs entre les membranes. En effet, les fluctuations qui amènent les deux membranes à des distances où les interactions attractives entre molécules d'adhérence peuvent se faire sentir sont beaucoup plus nombreuses. On s'attend alors à ce que l'adhérence se produise pour des distances moyennes de séparation entre les deux membranes plus grandes que pour des membranes passives (voir §II.4.1). Ce mécanisme pourrait donc jouer un rôle lors de l'adhérence cellulaire, même si le cas des membranes biologiques reste évidemment beaucoup plus complexe.

Troisième partie

Expériences

Chapitre III.1

Modèle expérimental de membrane active

Une membrane active fluctue sous l'effet de deux sources de bruit différentes : le bruit thermique passif et un bruit actif hors équilibre. Les vésicules lipidiques se sont révélées être un outil expérimental puissant et bien caractérisé théoriquement pour l'étude de membranes fluctuantes (voir §I.3). Elle constituent un système de choix pour modéliser une membrane active, à condition de pouvoir incorporer un élément actif dans la bicoche qui jouera le rôle de centre actif. Cet élément actif doit exercer une force locale sur la membrane vérifiant les conditions imposées pour être une source de bruit actif (voir partie II) : son activité implique donc une certaine dissipation d'énergie. Plusieurs possibilités sont envisageables : incorporation de canaux ou de pompes ioniques, utilisation de moteurs moléculaires... La source d'énergie mise en jeu est alors par exemple un gradient de potentiel électrochimique ou l'ATP. Nous avons choisi d'utiliser une protéine, la bactériorhodopsine (BR), qui transporte des protons d'un côté de la membrane à l'autre lorsqu'elle est activée par la lumière. La source d'énergie est, dans le cas de la BR, l'énergie apportée par les photons et présente l'avantage d'être facilement contrôlable.

III.1.1 Description générale du modèle

Le modèle expérimental que nous avons utilisé est schématisé sur la figure III.1.2. La BR est incorporée dans la membrane de vésicules lipidiques géantes (voir §III.1.3). Comme toute protéine membranaire, elle est libre de diffuser dans la bicouche lipidique. Lorsque les vésicules sont dans l'obscurité, ou éclairées en lumière rouge, la BR est inactive : la membrane des vésicules est passive. Si les vésicules sont éclairées en lumière jaune-verte, la BR absorbe des photons et pompe des protons : la membrane est active (voir §III.1.2, Fig. III.1.1). Le pompage de protons exerce une force locale, via le changement de conformation de la protéine et le passage des protons hydratés à travers la membrane. Cette force possède les caractéristiques d'une force active et la BR joue donc le rôle de centre actif dans la membrane (voir §§III.1.4 et III.1.5). Nous allons

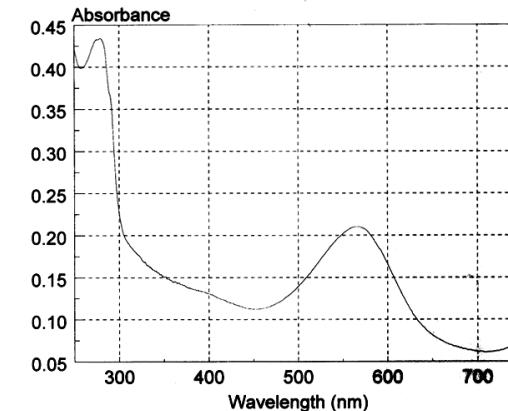


FIG. III.1.1: Spectre d'absorption UV-visible de la BR.

utiliser ce système simple comme modèle de membrane active pour tester la théorie de la partie II qui décrit les fluctuations de membranes actives en l'absence ou à proximité d'une paroi.

III.1.2 Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine (BR) est une protéine membranaire exprimée à la surface d'une archéobactérie, *Halobacterium salinarium* (aussi appelée *Halobacterium halobium*), d'une taille de $0.8 \mu\text{m}$ de diamètre. Ce microorganisme se développe dans les milieux extrêmement halophiles, c'est-à-dire très salés ($[NaCl] \simeq 4 \text{ M}$), par exemple des lacs hyper-salins ou des marais salants [Madigan et al., 1997]. Dans des conditions anaérobies, *H. salinarium* synthétise et concentre la BR dans des portions de membrane appelées membrane pourpre à cause de leur couleur violette. La BR possède un arrangement cristallin bidimensionnel hexagonal dans la membrane pourpre qui a permis de déterminer la structure de la bactériorhodopsine (voir §III.1.2.1). La BR contient un chromophore, le rétinal lié à une base de Schiff qui peut être protonnée ou non. Le rétinal présente un maximum d'absorption de la lumière autour de 568 nm, d'où la couleur pourpre de la membrane pourpre et de certains marais salants. Lorsque la BR reçoit un photon, le rétinal change de conformation et entraîne la translocation d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (voir §III.1.2.2). Si la lumière est assez intense, un gradient électrochimique de protons se forme à travers la membrane. Ce gradient de protons peut être utilisé pour synthétiser de l'ATP grâce à l'action d'une ATP synthase présente dans la membrane. Ce couplage entre la BR et l'ATP synthase permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique directement utilisable par la cellule sous forme d'ATP. De plus, *Halobacterium salinarium* possède plusieurs flagelles dont le mouvement lui permet de se déplacer selon les gradients d'intensité lumineuse.

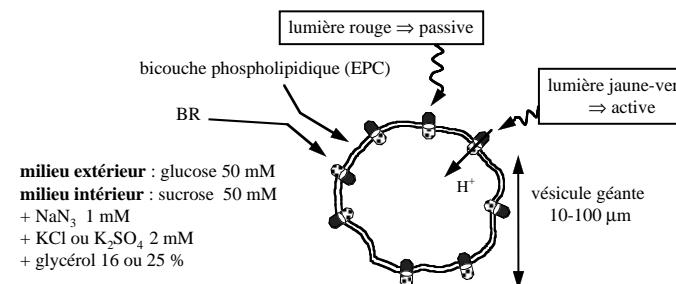


FIG. III.1.2: Modèle expérimental de membrane active : BR reconstituée dans une vésicule géante. Lorsque la vésicule est éclairée en rouge, la membrane est passive alors que lorsque le vésicule est éclairé en jaune, la membrane est active.

par le phénomène de phototactisme.

III.1.2.1 Structure de la BR

Le poids moléculaire de la BR est de $M_{BR} = 26 \text{ kDa}$ et sa séquence de 248 acides aminés est montrée sur la figure III.1.3. Le profil d'hydropathie de la BR montre que sa structure secondaire est organisée en 7 hélices α transmembranaires reliées par de courts domaines extramembranaires (voir Fig. III.1.4). L'extrémité N-terminale de la BR est dirigée du côté extracellulaire dans la bactérie, et l'extrémité C-terminale forme une queue cytoplasmique de 38 acides aminés.

L'organisation cristalline de la membrane pourpre a permis de déterminer la structure tridimensionnelle de la bactiorhodopsine par diverses techniques de diffraction. La résolution n'a cessé d'augmenter depuis les premières cartes de densité électroniques à 0.7 nm [Henderson and Unwin, 1975] : on atteint maintenant des résolutions voisines de 0.3 nm par cristallographie électronique [Kimura et al., 1997] et 0.25 nm [Pebay-Peyroula et al., 1997] ou 0.23 nm [Luecke et al., 1998] par diffraction de rayons X sur des cristaux de BR reconstitués dans des phases lipidiques cubiques. La structure tridimensionnelle est donnée sur la figure III.1.5. Le rétinal est lié de façon covalente à la lysine Lys^{216} de la BR par l'intermédiaire d'une base de Schiff. Lorsque la protéine est dénaturée, le rétinal sort de la BR et la couleur violette caractéristique du rétinal disparaît.

Ces données permettent aussi de déterminer la surface de la BR $S_{BR} \approx 8.75 \text{ nm}^2$ (soit un rayon $R_{BR} = 1.7 \text{ nm}$ si on modélise la BR par un disque) et de montrer qu'une dizaine de lipides entourent une protéine dans la membrane pourpre. On estime la densité de charges de la BR à environ deux charges négatives par BR à pH = 7 [Ebrey, 1993].

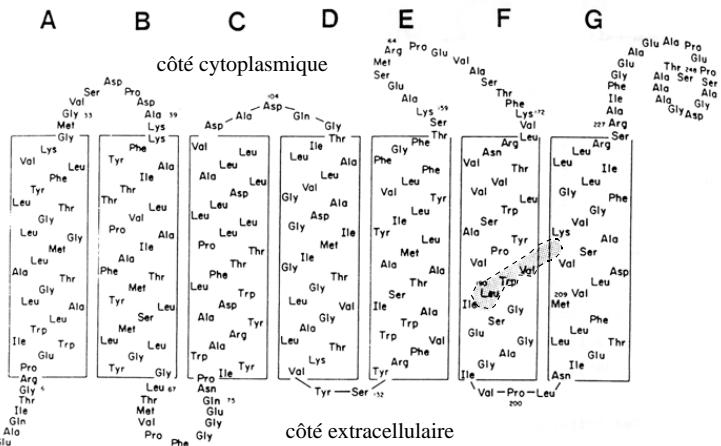


FIG. III.1.3: Séquence des acides aminés de la BR. Les sept hélices α sont notées de A à G. La partie grisée représente la position du rétinal (d'après [Oesterhelt and Tittor, 1989]).

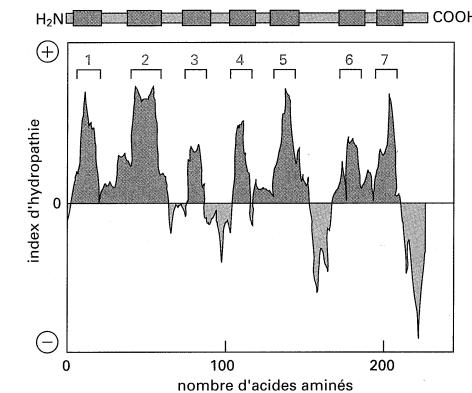


FIG. III.1.4: Profil d'hydropathie de la BR (d'après [Alberts et al., 1994]).

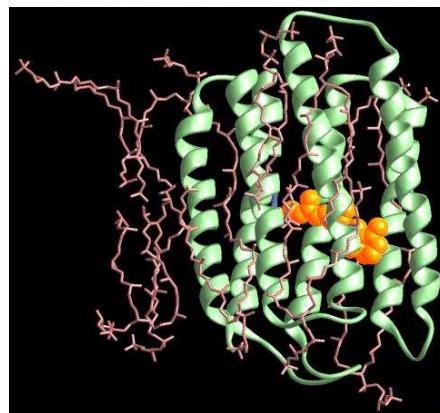


FIG. III.1.5: Structure tridimensionnelle de la BR. Les hélices α sont représentées en vert et le rétinal en orange.

III.1.2.2 Fonction de la BR

Le rétinal existe sous deux formes isomères : 13-cis ayant un maximum d'absorption à 548 nm et all-trans, ayant un maximum d'absorption à 568 nm (voir Fig. III.1.6). La forme all-trans est photochimiquement active, alors que la forme 13-cis ne l'est pas. Lorsque la BR est placée à l'obscurité (*dark-adapted BR*), les deux isomères sont présents dans un rapport équimolaire. Lors de l'*adaptation* à la lumière, l'isomère 13-cis se transforme rapidement en isomère all-trans : le mélange contient donc uniquement l'isomère actif all-trans [Kouyama et al., 1985, Ebrey, 1993]. Cette forme adaptée à la lumière (*light-adapted BR*) peut, lorsqu'un photon est absorbé autour de 568 nm, entrer dans un cycle photochimique complexe aboutissant à la translocation d'un proton du côté cytoplasmique vers le milieu extracellulaire. Le spectre d'absorption UV-visible de la forme adaptée à la lumière est donné à la figure III.1.1 et sera discuté plus en détail au paragraphe §III.1.4.1.

Le cycle photochimique de la BR adaptée à la lumière fait intervenir plusieurs intermédiaires de durée de vie variable, appelés J, K, L, M, N, O et caractérisés par leur maximum d'absorption (voir Fig. III.1.7) [Oesterhelt and Tittor, 1989, Birge, 1990]. Dans la première partie du cycle, le rétinal s'isomérase de all-trans en 13-cis et la base de Schiff se déprotone : le proton correspondant est transféré vers le côté extracellulaire via le résidu Asp⁸⁵, lors du passage de l'intermédiaire L à M. Puis, entre les intermédiaires M et N, la base de Schiff est reprotonée par l'intermédiaire du résidu Asp⁹⁶ situé du côté cytoplasmique. Le résidu Asp⁹⁶ est à son tour reprotoné et le rétinal retrouve sa conformation initiale all-trans [Lanyi, 1997]. Le bilan net est le passage d'un proton du côté intracellulaire vers l'extérieur (voir Fig. III.1.8). La durée totale d'un cycle est d'environ 5 ms à pH = 7 et à température ambiante. Son rendement est d'environ un proton pompé par

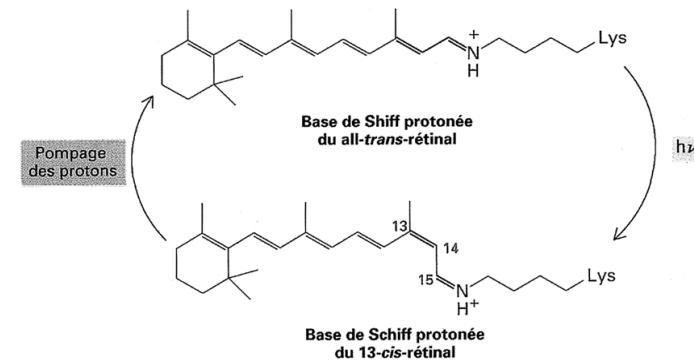


FIG. III.1.6: Formules des deux isomères 13-cis et all-trans du rétinal (d'après [Stryer, 1997]).

cycle.

Le déplacement dirigé du proton lors des différentes étapes du photocycle est bien expliqué par des changements de pKa des résidus accepteurs et donneurs de protons. Des techniques spectroscopiques ont permis de préciser le chemin emprunté par le proton lors de sa translocation à travers la membrane. Il semble que plusieurs molécules d'eau soient présentes au voisinage de la base de Schiff et forment un réseau de liaisons hydrogène favorisant le déplacement du proton [Luecke et al., 1998]. Certaines études suggèrent aussi l'existence d'importants changements de conformation de la protéine lors de la photoisomérisation [Lanyi, 1997, Kandori et al., 1998] (voir Fig. III.1.9), qui pourraient même aboutir à la formation transitoire d'un canal hydrophile dans la membrane [Hashimoto et al., 1998].

Une fois le proton transféré du côté extracellulaire, son devenir n'est pas très clair. Le transfert du proton vers la solution dépend du pH, ce qui confirme le rôle joué par certains acides aminés de la BR dans la migration du proton [Kono et al., 1993]. Il semble aussi que la diffusion du proton sur la surface de la membrane pourpre [Heberle et al., 1994] ou à la surface de systèmes micellaires reconstitués [Scherrer et al., 1994] soit plus rapide que son transfert vers le solvant aqueux.

Notons enfin l'importance de l'intermédiaire M au cours de la translocation du proton. Le photocycle peut être perturbé si la lumière qui active la BR contient beaucoup de courtes longueurs d'onde (bleu-violet vers 400 nm). L'intermédiaire M peut en effet absorber un photon de longueur d'onde voisine de son maximum d'absorption 410 nm : une 'branche' du cycle retourne alors directement à la conformation all-trans de la BR, le proton étant recapturé du côté extracellulaire, sans pompage net de proton (voir Fig. III.1.7). L'efficacité de la BR est alors notablement diminuée.

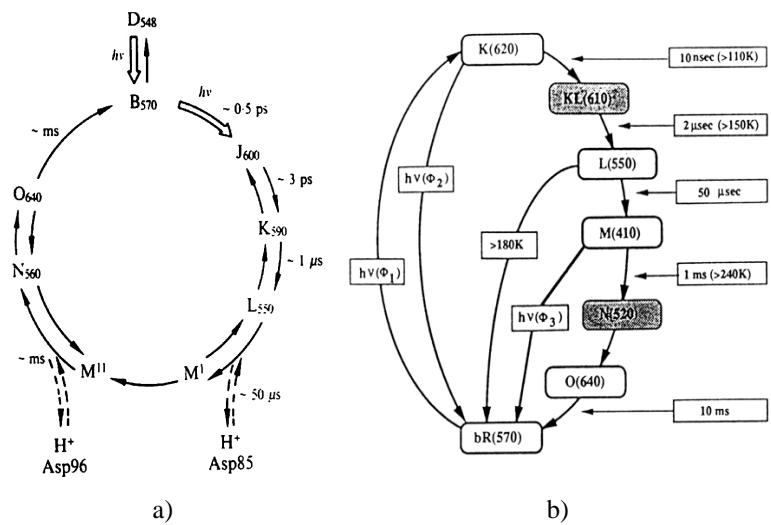


FIG. III.1.7: Deux représentations du cycle de la BR donnant les noms, maxima d'absorption et durées de vie des divers intermédiaires. a) Cycle sans branchement (d'après [Oesterhelt and Tittor, 1989]). b) Cycle branché montrant le retour à l'état initial à partir de l'intermédiaire M sans pompage de proton (d'après [Birge, 1990]).

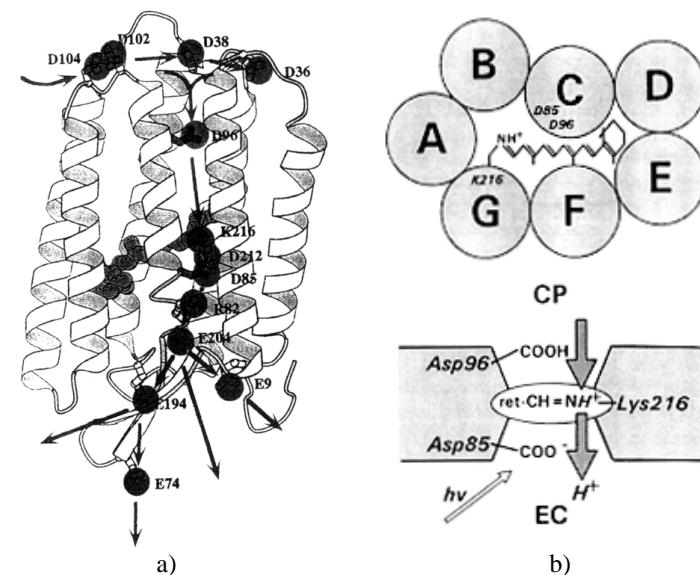


FIG. III.1.8: Translocation du proton au cours du photocycle. a) Modèle tridimensionnel : les flèches représentent différents trajets possibles du proton à sa sortie vers le milieu extracellulaire (d'après [Kimura et al., 1997]). b) Schémas simplifiés en vue de dessus et en coupe montrant les positions et le rôle des résidus Asp⁸⁵ et Asp⁹⁶ ainsi que la position du rétinal. Le côté cytoplasmique est noté CP, le côté extracellulaire EC.

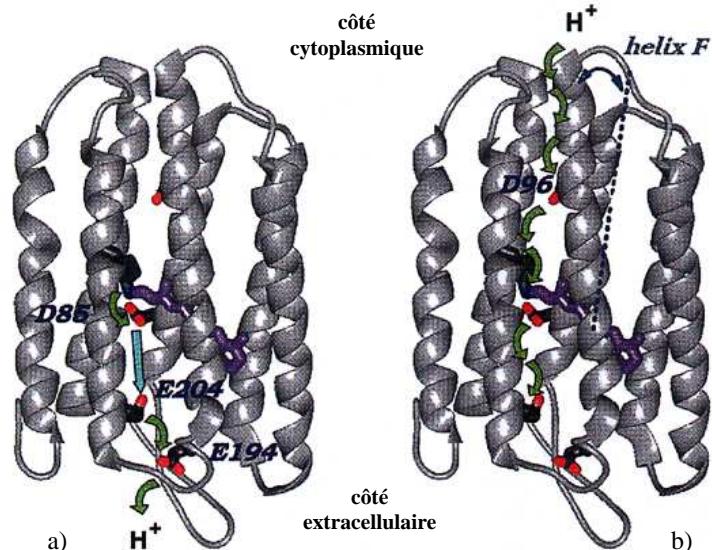


FIG. III.1.9: Changement de conformation de la BR au cours du photocycle. a) Première étape du photocycle (jusqu'à l'intermédiaire M). La base de Schiff du rétinal isomérisé 13-cis se déprotoonne vers le résidu Asp⁸⁵ (D85). Les interactions électrostatiques (flèche bleue) induites par la protonation de Asp⁸⁵ (D85) provoquent le transfert d'un proton du résidu Glu²⁰⁴ (E204) vers le résidu Glu¹⁹⁴ (E194) qui se déprotoonne ensuite vers la surface extracellulaire. b) Deuxième étape (après l'intermédiaire M) : un changement de conformation de la protéine aboutit à la rotation de l'hélice F (visualisée par la ligne en pointillés), qui entraîne l'hydratation de la région cytoplasmique de la BR et la reprotonation de la base de Schiff via le résidu Asp⁹⁶ (D96). Le résidu Asp⁹⁶ se reprotonne à partir du milieu cytoplasmique puis le rétinal se réisomérise en all-trans. Enfin, un proton est transféré du résidu Asp⁸⁵ vers le résidu Glu²⁰⁴ ce qui ramène la BR à son état initial (d'après [Lanyi, 1997]).

III.1.3 Reconstitution de la BR dans une membrane lipidique

La bactériorhodopsine est l'unique protéine constituant la membrane pourpre. Elle peut donc être assez facilement purifiée par lyse des cellules puis centrifugation. Cette purification a été effectuée par J.-L. Rigaud et D. Lévy (Laboratoire PCC, Institut Curie, Paris). On dispose ainsi de solutions aqueuses concentrées (18 mg/ml) de morceaux de membrane pourpre contenant essentiellement de la BR mélangée à quelques lipides de la membrane pourpre. Ces morceaux de membrane pourpre ont une taille de l'ordre de 0.5 µm et peuvent s'agréger facilement. Ces solutions sont stockées à l'abri de la lumière et congelées à -80°C.

La BR peut être reconstituée par diverses techniques dans une membrane lipidique (voir §I.3.1.1). Les lipides que nous avons utilisés sont l'EPC (*Egg yolk PhosphatidylCholine*) et l'EPA (*Egg Phosphatidic Acid*). Les formules chimiques de ces deux lipides sont représentées sur la figure III.1.10. L'EPC n'est pas un lipide pur : c'est un mélange de plusieurs lipides de même tête polaire mais de longueur de chaîne différentes, essentiellement C16 et C18. A pH=7, L'EPC est zwitterionique, alors que l'EPA présente une charge négative, ce qui nous a permis de tester l'influence d'éventuels effets électrostatiques.

La BR peut être reconstituée dans des 'petites' vésicules, LUVs de diamètre moyen de l'ordre de 0.2 µm, par la technique de réversion de phase [Rigaud et al., 1983]. L'avantage des LUVs est de pouvoir vérifier le fonctionnement de la BR en mesurant les variations de pH interne des vésicules. Nous avons utilisé cette technique pour effectuer différents contrôles (voir ci-dessous §III.1.4), mais nous ne détaillerons pas le protocole de formation des LUVs.

La BR peut aussi être incorporée dans la membrane de vésicules géantes GUVs. Grâce à D. Lévy, nous avons pu mettre en œuvre un protocole de formation de vésicules géantes contenant de la BR dans la membrane. Ce protocole est directement dérivé de la technique classique d'électroformation de GUVs [Angelova and Dimitrov, 1987, Angelova et al., 1992] et est décrit en détail dans l'annexe B.

On dépose un film mixte de lipides et de protéines dans un rapport connu à la surface de lames conductrices d'ITO (*Indium Tin Oxyde*, Thomson LCD). Ce film est séché sous vide. On forme ensuite la chambre d'électroformation en assemblant face à face deux lames d'ITO. L'étanchéité est assurée par une pâte de scellement. Les contacts sont réalisés par l'intermédiaire de lames de cuivre reliées à un générateur (voir Fig. III.1.11). Le mélange lipides/protéines est ensuite hydraté et placé sous champ électrique alternatif sinusoïdal (≈ 20 Hz) : on applique une rampe de tension jusqu'à 1 V pendant la première demi-heure puis le champ est maintenu constant pendant 2 – 3 heures (voir annexe B). On obtient des petites vésicules au bout d'une heure, puis celles-ci fusionnent pour donner des vésicules géantes unilamellaires de rayon 10 – 100 µm. Les vésicules sont formées en couches successives de taille croissante si on s'éloigne du dépôt (voir Fig. III.1.12). Les vésicules obtenues sont attachées entre elles et reliées au dépôt. Pour les détacher, on utilise un signal électrique alternatif carré de fréquence ≈ 4 – 5 Hz et d'amplitude 1.5 V.

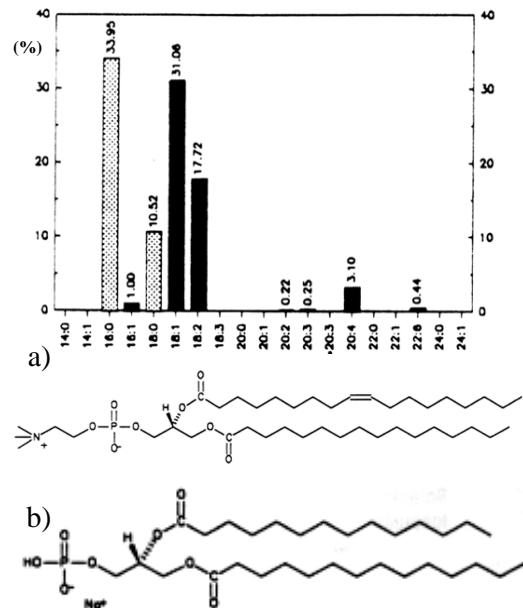


FIG. III.1.10: Formules des lipides utilisés. a) EPC : le diagramme en barre donne les pourcentages des différents types de chaînes hydrocarbonées présentes dans l'EPC. La notation X : Y désigne par X le nombre d'atomes de carbone et par Y le nombre d'insaturations présents dans la chaîne. b) EPA.

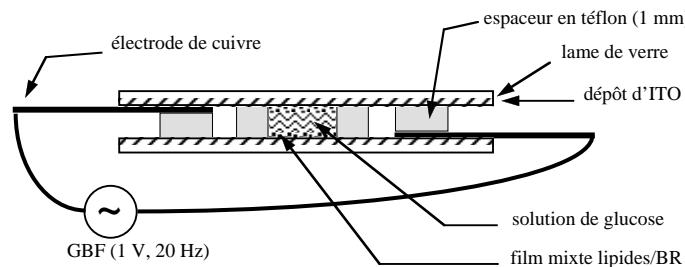


FIG. III.1.11: Schéma de la cellule d'électroformation.

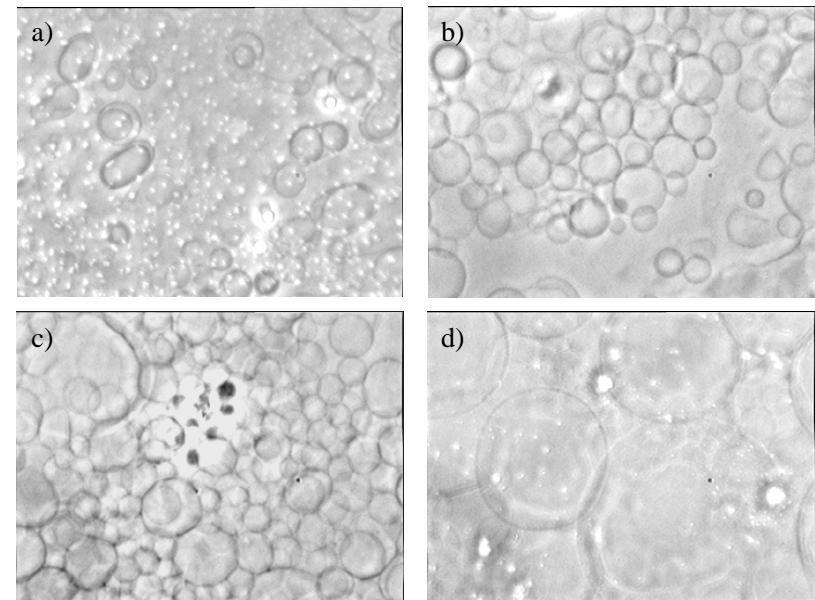


FIG. III.1.12: Electroformation de GUVs observée en contraste de phase. a) Après 30 min, mise au point près du dépôt. b) Après 55 min. c) Après 95 min. d) Après 120 min, mise au point sur les plus grosses vésicules, de rayon $\simeq 50 \mu\text{m}$, les plus éloignées du dépôt.

Les GUVs sont conservées à 4°C dans la chambre de formation. Le vieillissement des populations de vésicules entraîne l'apparition d'objets lipidiques pathologiques et la formation de lysolipides [Angelova et al., 1992, Méléard et al., 1992] (voir §I.3.1.5). Nous avons donc veillé à utiliser les vésicules au maximum dans les dix jours suivant leur électroformation. Lors des expériences, les vésicules sont transférées de la chambre de formation vers une chambre de manipulation : on aspire au ‘pipetman’ quelques microlitres de solution de vésicules que l'on resuspend dans une deuxième solution. Ce transfert a pour effet de rompre mécaniquement les liens qui pouvaient subsister entre les vésicules et le dépôt, et permet de contrôler la composition des milieux internes et externes des vésicules. Les vésicules sont formées dans un milieu contenant essentiellement du sucre puis sont transférées dans un milieu de même osmolarité, typiquement 50 mM, à base de glucose. Le sucre étant plus dense que le glucose, les vésicules en solution après transfert sédimentent, ce qui facilite leur recherche dans l'échantillon. La différence d'indice optique entre le glucose et le sucre (voir annexe A) permet aussi d'obtenir des images plus contrastées en microscopie à contraste de phase. Les milieux utilisés sont décrits dans l'annexe A. La technique d'électroformation impose une contrainte sur la force ionique maximale compatible avec la formation de GUVs : on ne peut pas dépasser des concentrations en sel voisines de 5 mM. L'inconvénient majeur est l'impossibilité de tamponner les milieux utilisés pour l'électroformation. Le pH des solutions de glucose et de sucre a été mesuré et reste voisin de 6.5 – 7.

III.1.4 Caractérisation du système

III.1.4.1 Bactériorhodopsine en solution

Le spectre d'absorption de la BR est mesuré par spectroscopie d'absorption UV-visible (spectrophotomètre UV2, ATI Unicam). La BR purifiée sous forme de petits morceaux de membrane pourpre en solution peut être directement utilisée pour obtenir le spectre d'absorption. Le tracé de ce spectre est indispensable car il permet de vérifier que la BR n'est pas dénaturée. Nous l'avons donc mesuré régulièrement et systématiquement à chaque nouveau lot de BR.

La forme du spectre peut être fortement perturbée par la diffusion due à des agrégats de membrane pourpre : la suspension de BR doit donc être vortexée suffisamment, voire légèrement soniquée pour dissocier les éventuels agrégats. Un spectre typique a été présenté à la figure III.1.1 (p. 148). On observe un pic à 280 nm caractéristique de l'acide aminé tryptophane (Trp) présent dans toutes les protéines [Durliat, 1997] et une large bande d'absorption centrée vers 570 nm caractéristique du rétinal lié à la BR. Si la protéine est dénaturée, le rétinal passe en solution et son spectre présente alors un maximum à 380 nm : la solution de couleur caractéristique violette devient jaune. Le rapport entre l'absorbance à 280 nm et l'absorbance à 570 nm indique le niveau de pureté de la préparation et doit être voisin de 2 : $A_{280}/A_{570} \geq 2$ [Sternberg et al., 1989]. Le spectre d'absorption permet aussi de doser la protéine en solution. Le coefficient d'extinction molaire à 570 nm est $\epsilon_{BR} = 63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La loi de Beer-Lambert permet de déduire la

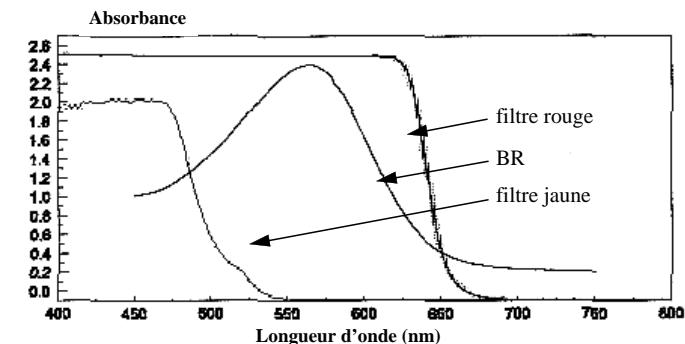


FIG. III.1.13: Comparaison des spectres d'absorption des filtres jaune et rouge utilisés respectivement pour activer ou non la BR au spectre d'absorption de la BR.

concentration massique en BR par : $c_{BR} = A_{570} M_{BR} / \epsilon_{BR} l$, où $M_{BR} = 26000 \text{ g/mol}$ est le poids moléculaire de la BR, et $l = 1 \text{ cm}$ est la taille des cuves de spectrophotométrie. On trouve une concentration massique en g/l égale à : $c_{BR} = 0.413 A_{570}$.

Pour éviter d'exciter le cycle secondaire faisant intervenir l'intermédiaire M à 410 nm sans pompage net de proton (voir §III.1.2.2), tout en excitant le cycle principal de pompage à 570 nm, nous utiliserons dans les expériences un filtre passe-haut jaune qui coupe les longueurs d'onde inférieures à 500 nm. Comme on peut le voir sur le spectre d'absorption de la BR, l'absorption chute dans le rouge. Dans les expériences contrôles où la BR ne sera pas excitée, nous éclairerons donc la préparation à l'aide d'un filtre passe-haut rouge coupant les longueurs d'onde inférieures à 640 nm (voir Fig. III.1.13).

Pour vérifier que la BR est bien sous sa forme adaptée à la lumière (*light-adapted*) dans nos expériences, nous avons mesuré le spectre d'absorption au cours du temps d'un échantillon initialement à l'obscurité (*dark-adapted*) puis illuminé pendant des intervalles de temps réguliers. Les résultats sont montrés à la figure III.1.14. On observe en quelques minutes un décalage progressif du maximum d'absorption vers 568 nm caractéristique de la forme adaptée à la lumière (voir §III.1.2.2). Lorsque l'échantillon est remis à l'obscurité, le maximum d'absorption retourne plus lentement, environ 30 minutes, vers sa valeur initiale de 548 nm. Ces tests ont été effectués en éclairant la BR avec une lumière jaune : le filtre jaune utilisé ici est le même que celui utilisé pour exciter la BR dans les expériences sur une membrane active. L'intensité de la lampe est comparable à celle du microscope sur lequel les expériences ont été faites (voir ci-dessous). Nous n'avons pas effectué ce test avec la lumière rouge utilisée dans les expériences sur une membrane passive. Cependant, il est connu qu'une lumière rouge provoque aussi l'adaptation à la lumière, mais de manière légèrement moins efficace qu'en lumière jaune [Kouyama et al., 1985].

Dans les suspensions de membrane pourpre, la BR est toujours organisée en réseau cristallin,

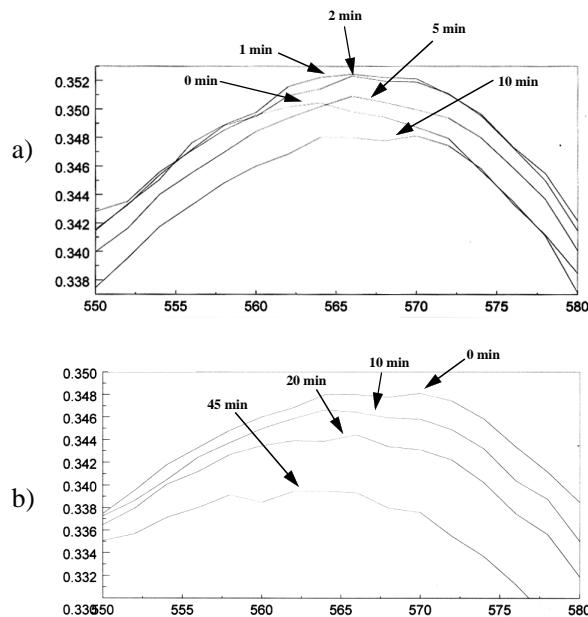


FIG. III.1.14: Adaptation de la BR à la lumière. a) Décalage progressif du maximum d'absorption de la BR vers 568 nm lors de l'adaptation à la lumière (durée totale d'éclairement 10 min). b) Diminution du maximum d'absorption lorsque la BR est remise à l'obscurité (durée totale 45 min).

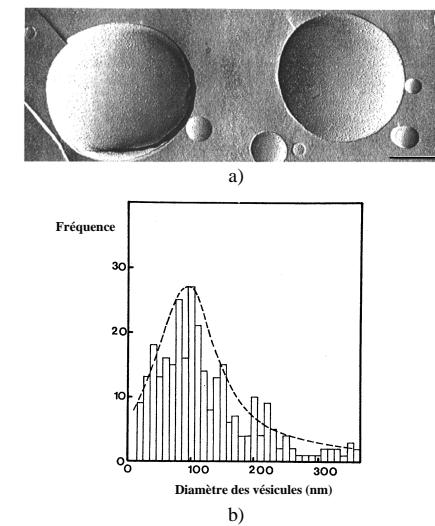


FIG. III.1.15: Reconstitution de la BR dans les LUVs par réversion de phase. a) Images de LUVs en microscopie électronique. La BR est visible sous forme de petits points dans la membrane. La barre représente $0.2\mu\text{m}$. b) Distribution de tailles des LUVs obtenues par réversion de phase (d'après [Gulik-Krzywicki, 1987]).

dans un rapport d'une dizaine de lipides par BR. Dans un morceau de membrane pourpre donné, les molécules de BR sont toutes orientées dans le même sens, de façon à pomper les protons de l'intérieur vers l'extérieur de *H. salinarium*. Qu'en est-il dans les systèmes reconstitués ?

III.1.4.2 Caractérisation de la bactériorhodopsine reconstituée dans les ‘petites’ vésicules LUVs

La technique de réversion de phase, permet la formation de vésicules unilamellaires dont la distribution de taille présente un maximum autour de $0.2\mu\text{m}$ (voir Fig. III.1.15). Nous avons appris cette technique en collaboration avec J.-L.Rigaud.

Orientation de la bactériorhodopsine dans la bicouche lipidique

Une sonde fluorescente sensible au pH, la pyranine ($\lambda_{exc} = 454 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$), peut être encapsulée dans les vésicules (voir annexe A). L'intensité de fluorescence de la pyranine en fonction du pH est donnée à la figure III.1.16. En suivant au fluorimètre (LS50B, Perkin Elmer) la variation de l'intensité de fluorescence de la pyranine au cours du temps, on a accès à la cinétique

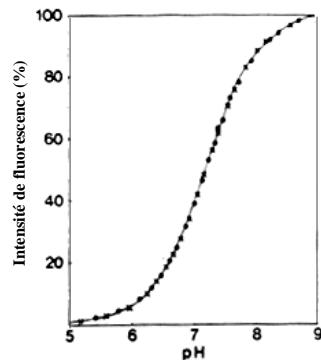
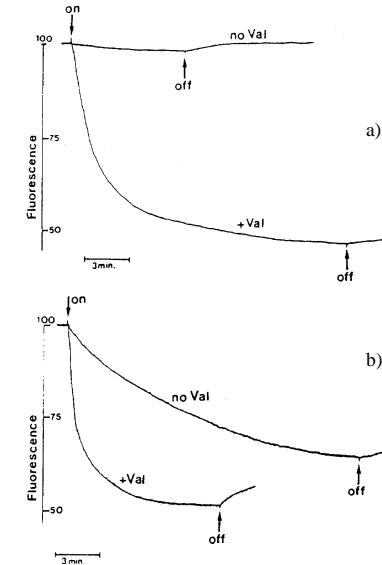


FIG. III.1.16: Variation de l'intensité de fluorescence de la pyranine en fonction du pH.

de pompage de la BR [Seigneuret and Rigaud, 1985]. Il a été ainsi montré que le pH interne des vésicules diminue et donc que l'orientation de la BR dans les LUVs est majoritairement dans le sens inverse de l'orientation dans la membrane pourpre. On observe en fait deux populations de vésicules : la majorité (80 %) pompent les protons vers l'intérieur, alors que certaines (20 %) pompent les protons vers l'extérieur [Seigneuret and Rigaud, 1985]. Dans les deux populations, il semble que la BR soit orientée à 100 % dans un sens. Cette complète asymétrie est certainement due à la méthode de réversion de phase elle-même, qui, par nature est asymétrique. La taille des vésicules semble imposer l'orientation de la BR. En effet, si les vésicules sont filtrées pour sélectionner leur taille, la proportion de vésicules pompant vers l'extérieur augmente si la taille moyenne des vésicules diminue [Seigneuret and Rigaud, 1988]. Un effet de courbure pourrait être à l'origine du changement d'orientation pour les vésicules de petite taille : la BR n'est pas symétrique, notamment à cause de la présence d'une queue cytoplasmique de 38 acides aminés (voir Fig. III.1.3), une orientation préférentielle pourrait donc être imposée par la courbure de la membrane (voir §1.3.2.2). Notons cependant que le rayon de courbure des LUVs est grand devant les dimensions de la BR et que l'existence de ces deux populations de vésicules pourrait aussi être une conséquence de la méthode de formation par réversion de phase. Lors de l'étape de filtration par exemple, les plus petites vésicules pourraient s'ouvrir puis se refermer sur elles-mêmes dans l'autre sens, et l'orientation initiale de la BR est alors inversée.

Les conditions d'éclairage utilisées (longueur d'onde jaune-verte et intensité lumineuse de l'ordre de 100 mW sur l'échantillon) provoquent l'activation à saturation de toutes les BRs présentes [Hellingwerf et al., 1979, Seigneuret and Rigaud, 1986]. On peut s'en rendre compte par un calcul d'ordre de grandeur simple. Une molécule de BR absorbe au plus un photon toutes les $\tau = 5$ ms. La section efficace d'absorption est de l'ordre de la surface du rétinal : $\sigma_{BR} \simeq 10 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ (on peut aussi estimer la section efficace d'absorption de la BR à partir de la loi de Beer-Lambert : la section efficace σ_{BR} est reliée au coefficient d'extinction molaire

FIG. III.1.17: Variation de l'intensité de fluorescence de la pyranine dans les LUVs en fonction du temps au cours de l'activation de la BR. a) Dans un tampon potassium 20 mM à pH = 7.1 et 130 mM de K_2SO_4 avec ou sans $0.01 \mu\text{M}$ de valinomycine. b) Dans un tampon potassium 20 mM à pH = 7.1 et 150 mM de KCl avec ou sans $0.01 \mu\text{M}$ de valinomycine. 'on' et 'off' indiquent le début et la fin de l'éclairage jaune-vert (d'après [Seigneuret and Rigaud, 1986]).

ϵ_{BR} par $\sigma_{BR} = (\ln 10 \times 10^{-1})\epsilon_{BR}/N_a \simeq 2.5 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ ce qui redonne bien le même ordre de grandeur que précédemment). La BR peut donc absorber au maximum une puissance par unité de surface égale à $P_{max} = h\nu/\tau\sigma_{BR} \simeq 0.7 \times 10^3 \text{ W/m}^2$. La lumière jaune d'intensité 100 mW utilisée dans les expériences est focalisée sur une surface de l'ordre de 1 cm^2 , ce qui correspond à une puissance incidente par unité de surface de $P_{inc} \simeq 10^3 \text{ W/m}^2$. On a donc $P_{inc} > P_{max}$ et les molécules de BR pompent *a priori* les protons au maximum de leurs possibilités.

Lorsque les vésicules sont éclairées en lumière jaune, les protons sont pompés et une différence de pH et de potentiel électrique apparaît de part et d'autre de la membrane. Ce gradient électrochimique de protons inhibe aussitôt l'activité de pompage de la BR. Un régime stationnaire est rapidement atteint, où la BR ne pompe que très peu de protons. Pour détruire le gradient de potentiel électrique, une solution consiste à utiliser des milieux contenant des ions potassium K^+ et de les faire sortir passivement alors que les protons entrent. Ceci peut être réalisé à l'aide d'un antibiotique qui joue le rôle d'ionophore potassique, la valinomycine (voir annexe A). En présence de valinomycine, la BR pompe les protons et un régime stationnaire avec une diffé-

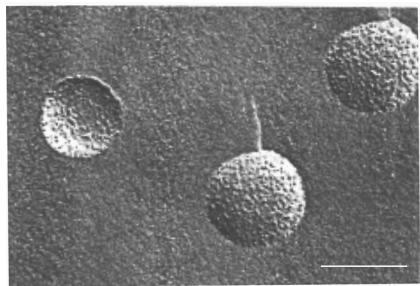


FIG. III.1.18: Image de LUVs à forte densité de BR (30 lipides/protéines) en microscopie électronique : formation d'agrégats de BR donnant un aspect granuleux à l'image. La barre représente 0.2 μm. (d'après [Gulik-Krzywicki, 1987]).

rence de pH de l'ordre de deux unités est atteint en une dizaine de minutes dans ces conditions [Seigneuret and Rigaud, 1986]. Lorsque les ions potassium sont présents sous la forme de KCl, le pompage se produit même en l'absence de valinomycine, certainement grâce à une redistribution des ions Cl⁻ par codiffusion de HCl à travers la membrane vers le milieu extérieur et/ou par entrée passive de Cl⁻ (voir Fig. III.1.17) [Seigneuret and Rigaud, 1986]. Lorsque l'éclairage jaune est stoppé, les protons fuient lentement de façon passive à travers la membrane et le gradient de pH diminue. La fuite de protons peut être accélérée par l'addition d'un ionophore protonique, le FCCP (voir annexe A).

Densité surfacique de bactériorhodopsine incorporée

Le rapport lipides/protéines dans les vésicules est déterminé par les quantités relatives de lipides et de BR utilisées lors de la réversion de phase. Des études de microscopie électronique ont montré que pour des rapports inférieurs à 1250 lipides/protéines, la BR s'assemble pour former des agrégats. Aux plus fortes concentrations de BR accessibles par réversion de phase, soit environ 30 lipides/protéines, les agrégats sont constitués de 3–4 molécules de BR [Gulik-Krzywicki, 1987] (voir Fig. III.1.18).

III.1.4.3 Caractérisation de la bactériorhodopsine reconstituée dans les vésicules géantes GUVs

Densité surfacique de bactériorhodopsine incorporée

La reconstitution de la BR dans les vésicules géantes est beaucoup plus difficile à caractériser que dans le cas des LUVs, tant sur le plan de l'orientation que sur celui de la concentration de BR incorporée.

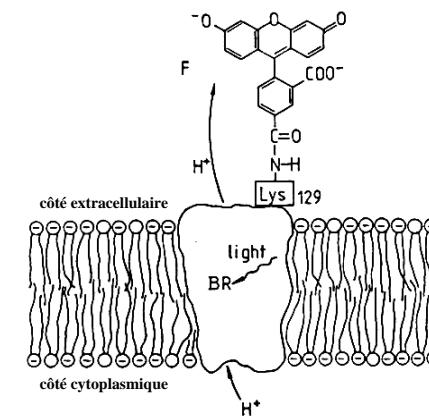


FIG. III.1.19: Couplage covalent du FITC à la BR (d'après [Heberle and Dencher, 1992]).

On peut, comme pour les LUVs, supposer que le rapport lipides/protéines dans les vésicules est le même que dans le dépôt initial. On peut alors obtenir modifier la densité surfacique de BR en jouant sur le rapport lipides/protéines dans le mélange initial. Les poids moléculaires respectifs de la BR et de l'EPC sont 26000 g/mol et 760 g/mol ; les surfaces couvertes par une molécule de BR et d'EPC sont respectivement 8.75 nm² et 0.5 nm². On peut, à l'aide de ces données, calculer le rapport lipides/protéines de différentes façons : nombre de molécules de lipides/protéine, rapport poids/poids ou pourcentage de surface couverte par la BR. On a pu former des GUVs (voir annexe B) contenant *a priori* jusqu'à 60 lipides/BR, ce qui correspond à un rapport lipides/BR de 1.6 poids/poids, soit presque 25 % de surface couverte par la BR.

Pour vérifier l'incorporation de la BR dans les vésicules, nous avons utilisé, en collaboration avec D. Lévy, un marquage fluorescent de la BR [Heberle and Dencher, 1992]. Le protocole de marquage est décrit dans l'annexe C. La sonde fluorescente, la fluorescéine FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*, $\lambda_{exc} = 494$ nm, $\lambda_{em} = 519$ nm), est liée de façon covalente à une cystéine de la BR (voir Figs. III.1.19). On s'assure que la BR n'est pas dénaturée par le marquage fluorescent en retrouvant le spectre caractéristique de la BR. La fluorescence de la BR marquée est vérifiée par spectrométrie de fluorescence (fluorimètre LS50B, Perkin Elmer). La figure III.1.20 présente les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la BR liée au FITC : les longueurs d'onde d'émission et d'excitation correspondent bien à celles de la fluorescéine.

Les GUVs contenant la BR fluorescente sont formées par la technique d'électroformation décrite au paragraphe §III.1.3. Les vésicules sont observées en transmission par contraste de phase (trans-illumination) et en lumière réfléchie par fluorescence (épi-illumination). On excite la fluorescence des vésicules en épi-fluorescence à l'aide d'un laser Argon (Stabilite 2017-05S ou Beamlok 2060-4S, Spectra Physics) à la longueur d'onde 488 nm, ce qui permet de limiter

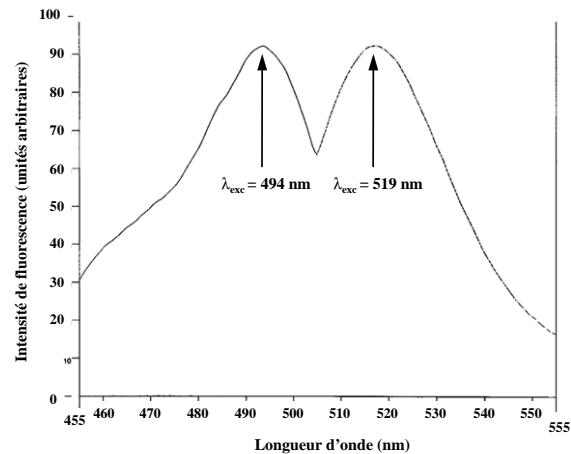


FIG. III.1.20: Spectre d'excitation et d'émission de la fluorescence de la BR marquée au FITC.

le bruit de fond. Le laser est couplé au microscope par l'intermédiaire d'une fibre optique (voir §III.2.1.2 pour une description plus précise du montage). Les images de fluorescence sont obtenues via une caméra SIT (*Silicium Intensified Target*) permettant de détecter de très bas niveaux de fluorescence (LH4036, Lhesa). La figure III.1.21 donne un exemple d'image de vésicules, formées à partir du même dépôt, en contraste de phase et en fluorescence. On voit clairement que l'intensité de fluorescence diffère d'une vésicule à l'autre, alors que la densité déduite *a priori* du rapport lipides/protéines dans le film initial est la même. Nous avons donc utilisé l'intensité de fluorescence comme indicateur de la concentration de BR, plutôt que la densité déduite *a priori*. La fluorescence est quantifiée par analyse du niveau de gris sur les images numérisées par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition (Meteor, Matrox) et d'un PC. On s'affranchit du bruit de fond en contrôlant l'intensité incidente du laser et en mesurant l'intensité de fluorescence relative $I_F = \Delta F/F = (F_{\text{ves}} - F_{\text{fond}})/F_{\text{fond}}$ où F_{ves} est l'intensité de fluorescence de la vésicule et F_{fond} est celle du fond.

Nous avons constaté que si on augmente la rapport lipides/protéines dans le film initial, la fluorescence relative moyenne augmente. Nous avons donc formé des GUVs avec un rapport lipides/protéines *a priori* élevé (80 lipides/protéines, soit un rapport poids/poids de 2.3, ou 10% de surface couverte par la BR). La distribution de l'intensité de fluorescence des vésicules est alors assez large et permet d'obtenir une gamme de fluorescence variant de près d'un facteur 10 ($I_F \simeq 0.1 - 1$). La technique de fluorescence permet de faire la distinction entre vésicules unilamellaires et multilamellaires caractérisées par une fluorescence anormalement élevée (typiquement $I_F \simeq 2$), et d'éliminer les vésicules pathologiques attachées par des filaments lipidiques. La fluorescence ne fournit cependant qu'une indication relative de la densité surfacique de BR incorporée dans

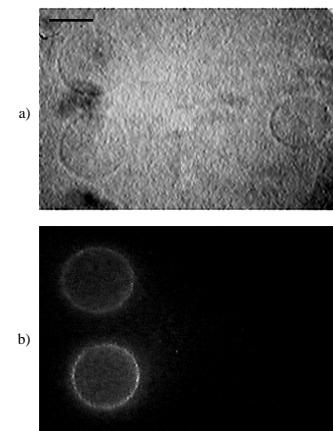


FIG. III.1.21: Comparaison des images de contraste de phase a) et de fluorescence b) des mêmes vésicules géantes formées à partir d'un même mélange lipides/protéines. La barre représente 50 μm .

la membrane.

Si on observe le dépôt initial en fluorescence et en contraste de phase, on voit que le film mixte lipides/protéines est très hétérogène : certaines zones du dépôt sont beaucoup plus denses que d'autres. La BR est même parfois agrégée dans des amas très fluorescents. Il n'est donc pas très étonnant que la fluorescence et donc la densité de BR varie d'une vésicule à l'autre, selon que les vésicules proviennent d'une région du dépôt plus ou moins riche en BR. Après formation des vésicules, on s'aperçoit qu'il reste encore de nombreux agrégats fluorescents sur la lame d'ITO. Toute la BR n'est donc pas incorporée dans les vésicules. Cela peut être vérifié par un calcul simple. On dépose environ 3 μg de BR pour une chambre de formation de GUVs (voir annexe B). Si on suppose que le rapport lipides/protéines dans les vésicules est le même que dans le film d'électroformation soit environ 100 lipides/BR, on trouve 10^7 molécules de BR pour une vésicule de 10 μm de rayon. On forme au plus environ 10^6 vésicules par chambre (on peut en observer au plus une cinquantaine sur une image de 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, la surface totale du dépôt sur les deux lames d'ITO de la chambre de formation est de $2 \times 1 \text{ cm}^2$). On a donc dans les vésicules une masse totale de BR de l'ordre de 0.4 μg , soit un dixième de la masse de BR présente dans le film initial. Ceci confirme le fait que toute la BR ne s'incorpore pas dans les vésicules. De la même façon, il doit rester des lipides dans le film d'électroformation. Il est donc difficile de donner une valeur précise de la densité de BR présente dans les vésicules. On peut tout de même supposer raisonnablement que le rapport lipides/protéines est, en moyenne, du même ordre dans les vésicules et dans le dépôt initial, soit environ 100 lipides/BR.

Orientation de la bactériorhodopsine dans la bicouche lipidique

Déterminer l'orientation de la BR dans les vésicules géantes est beaucoup plus difficile que dans le cas des LUVs à cause du grand volume interne des vésicules géantes. On peut penser, comme pour les LUVs, quantifier la fluorescence d'une sonde sensible au pH, par exemple la pyranine, encapsulée dans les vésicules. Des calculs d'ordre de grandeur permettent d'estimer la variation de pH attendue. Le rayon typique d'une vésicule géante est 100 fois plus grand que celui d'une LUV. Le nombre de protéines se comporte comme R^2 , alors que la concentration en protons se comporte comme $1/R^3$. La variation de la concentration de protons devrait donc être 100 fois plus faible dans le cas des vésicules géantes que dans le cas des LUVs. Si on suppose, par analogie avec les LUVs, que toutes les molécules de BR sont orientées dans le même sens et que la cinétique de pompage est la même, une diminution du pH = 7 à pH = 5 obtenue en 10 minutes avec les LUVs serait atteinte en une dizaine d'heures avec les GUVs. De la même façon, pour une durée d'éclairage de l'ordre de 10 minutes, on devrait obtenir une diminution de de pH = 7 à pH = 6.7 pour les GUVs. D'après la figure III.1.16, on voit que cette variation de pH correspond à une faible diminution de l'intensité relative de fluorescence de la pyranine. Ces tests sont techniquement compliqués et difficiles à interpréter, surtout à cause de l'impossibilité de tamponner le milieu de formation des GUVs, alors que les tests de pompage sont effectués en milieu tamponné dans le cas des LUVs. Nous présenterons quelques résultats préliminaires au paragraphe §III.3.1.1 qui suggèrent que l'orientation de la BR dans les GUVs pourrait être symétrique.

Si on compare les deux techniques de fabrication des vésicules, on peut comprendre pourquoi la BR pourrait être distribuée de façon symétrique dans les GUVs, contrairement aux LUVs. La technique de réversion de phase est par nature asymétrique, alors que l'électroformation sous champ alternatif ne l'est pas. Les tailles des vésicules formées sont aussi très différentes. Il est possible que l'orientation de la BR soit imposée par la forte courbure des LUVs, alors que la courbure 100 fois plus faible ne joue aucun rôle au moment de l'incorporation dans les GUVs.

III.1.5 Quelques ordres de grandeur

Pour pouvoir analyser les résultats expérimentaux à la lumière des prévisions théoriques, il est indispensable de connaître les valeurs des paramètres qui interviennent dans le modèle théorique. Quelques ordres de grandeur ont été donnés au chapitre II.4, notamment dans le cas de canaux ioniques, qui présentent l'avantage de pouvoir être traités explicitement (voir §II.1.1.4). Nous allons donner ici quelques idées pour estimer ces ordres de grandeur dans le cas de la bactériorhodopsine reconstituée dans les GUVs.

III.1.5.1 Grandeur caractéristiques de la membrane lipidique et des milieux utilisés

Les vésicules géantes sont constituées d'EPC, et éventuellement de 10% d'EPA. Les propriétés élastiques de ces membranes sont bien caractérisées et nous avons vérifié que nous retrouvons bien les données de la littérature dans les conditions de nos expériences (voir §III.2). Le module de courbure est $\kappa = 10 kT = 4 \times 10^{-20}$ J et la tension pourra être contrôlée entre $\sigma = 10^{-7}$ N/m et $\sigma = 10^{-4}$ N/m.

La viscosité du milieu aqueux sera voisine de celle de l'eau, $\eta = \eta_{eau} = 10^{-3}$ kg/m.s, pour les milieux de glucose et sucre utilisés le plus souvent (50 mM). Dans certaines expériences (voir §III.2.2.3), la viscosité sera augmentée $\eta = 1.5\eta_{eau}$ et $\eta = 2\eta_{eau}$ par addition de glycérol (voir annexe A).

III.1.5.2 Grandeur caractéristiques de la force exercée par la BR

Dans le modèle expérimental utilisé, la bactériorhodopsine reconstituée dans des vésicules géantes joue le rôle de centre actif. L'activité d'une BR donnée est asymétrique puisque la translocation du proton s'effectue toujours dans le même sens. La force hors équilibre F_a est donc de moyenne non nulle, $F_a \neq 0$, et on s'attend donc à observer essentiellement les effets du bruit dû aux fluctuations de densité de BR. Comme nous l'avons déjà souligné, l'effet de l'activité dû aux fluctuations de densité des centres actifs est caractérisé par le flux $\Phi = \lambda_p F_a$. Nous avons vu au paragraphe §II.4.2.1 que l'évaluation de Φ n'est pas évidente, même dans le cas des canaux ioniques dont les fonctions de transport sont pourtant caractérisées par de nombreuses données expérimentales d'électrophysiologie. Dans le cas de la BR reconstituée dans les GUVs, il semble donc encore plus difficile d'estimer Φ *a priori*.

Microscopiquement, la force F_a s'exerce lors du photocycle pendant la durée $\tau = 5$ ms, et est créée par le passage du proton à travers la membrane et par les différents changements de conformation de la protéine. On peut l'estimer de façon grossière comme : $F_a \simeq kT/e \simeq 10^{-12}$ N, où e est l'épaisseur de la membrane, en supposant que les changements de conformation impliquent des énergies de l'ordre de kT . On peut aussi utiliser un modèle hydrodynamique, analogue à celui présenté au chapitre II.4. La force de friction exercée sur la membrane par le passage d'un proton à travers la membrane est : $F_a = (6\pi R_{H+})\eta_{mb}v_{H+}$, où $R_{H+} \simeq 0.1$ nm est le rayon d'un proton hydraté, $v_{H+} = e/\tau \simeq 1\mu\text{m}/\text{s}$ est la vitesse de passage du proton à travers la membrane, et $\eta_{mb} = 10^5\eta_{eau} = 10^2$ kg/m.s est la viscosité de compression de la membrane. On trouve une force du même ordre de grandeur que précédemment : $F_a \simeq 10^{-12}$ N. Si quelques molécules d'eau sont impliquées lors du passage du proton, comme semblent le suggérer certaines études structurales récentes (voir §III.1.2.2), la friction hydrodynamique sur la membrane pourrait alors être beaucoup plus importante.

Les défauts dans la membrane lipidique au voisinage des protéines tendent à faciliter le

passage de l'eau à travers la membrane. Dans le cas particulier de la BR, l'ouverture d'un canal aqueux pourrait même se produire lors du photocycle [Hashimoto et al., 1998], ce qui augmenterait alors fortement la perméabilité à l'eau. Enfin, lorsque la membrane est sous tension, elle devient plus perméable et on s'attend encore à ce que le coefficient de perméation λ_p augmente par rapport au cas d'une bicouche purement lipidique [Bernard, 1999].

Les autres paramètres qui interviennent dans les modèles théoriques, la densité de BR ρ , le temps d'autocorrélation de la force τ et le coefficient de diffusion D , sont plus faciles à estimer. L'effet de l'activité peut en principe être modulé en changeant la densité ρ de BR à la surface des vésicules, puisque ρ intervient dans les deux sources de bruit actif, aussi bien dans le terme de fluctuations de densité que dans celui de bruit de 'shot'. Si on utilise la valeur de la densité déduite *a priori* du rapport lipides/protéines, on trouve, pour 100 lipides/BR, un espacement de l'ordre de $l = 10 \text{ nm}$ entre les molécules de BR, soit une densité moyenne de $\rho = 10^{16} \text{ m}^{-2}$.

Le temps d'autocorrélation de la force qui caractérise le bruit de 'shot' peut être identifié à la durée du photocycle $\tau = 5 \text{ ms}$. Un changement de l'efficacité du photocycle, par exemple via l'intensité de l'éclairement, a un effet sur la statistique de l'activité de la BR, donc sur le terme de bruit de 'shot', que l'on peut modéliser par un effet sur le temps d'autocorrélation τ . L'intensité de l'éclairement pourrait aussi modifier la valeur de la force F_a , donc la source de bruit due aux fluctuations de densité de BR.

Enfin, nous supposerons que le coefficient de diffusion D de la BR dans la bicouche lipidique est de l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion typique d'une protéine membranaire isolée soit $D \simeq 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Cette valeur pourrait cependant être différente si la BR est présente sous forme d'agrégats dans la membrane des vésicules (voir §III.3.1.3).

La démarche que nous allons utiliser dans la suite consiste à déduire la valeur de $\Phi = \lambda_p F_a$ à partir des expériences, en appliquant les modèles théoriques de la partie II et en utilisant les valeurs de ρ , τ et D données ci-dessus. Nous discuterons ensuite (voir §III.2.3.4) les ordres de grandeur obtenus.

Chapitre III.2

Expériences de micropipettes

Nous avons utilisé le modèle expérimental décrit au chapitre précédent pour étudier les fluctuations de forme d'une membrane active libre. L'analyse théorique de cette situation a été décrite au paragraphe §II.1. La technique expérimentale employée pour quantifier l'amplitude des fluctuations des vésicules est la technique d'aspiration par micropipettes (voir §I.3.1.5). Le résultat le plus important de ces expériences et que nous allons développer dans la suite est l'observation d'une augmentation de l'excès de surface dû aux fluctuations lorsque la BR est activée.

III.2.1 Principe et montage de la technique de micropipettes

Lorsqu'une vésicule fluctue, un certain excès de surface de membrane $\Delta A/A$ est stocké dans les fluctuations (voir §I.1.2.2). On peut 'défroisser' la membrane en la mettant sous tension et ainsi mesurer l'excès de surface qui caractérise l'amplitude des fluctuations. Une façon simple et précise à la fois pour contrôler la tension de la membrane consiste à aspirer les vésicules à l'intérieur d'une micropipette. La tension peut être finement ajustée par la différence de pression que l'on applique et la longueur de membrane qui pénètre à l'intérieur de la pipette mesure l'excès de surface.

III.2.1.1 Analyse théorique des expériences de micropipettes

La géométrie et les notations sont données sur la figure III.2.1. On fait les approximations suivantes :

- Le volume de la vésicule est constant.
- Le nombre de molécules de lipides constituant la vésicule est constant.
- La vésicule glisse librement sur les parois de la micropipette à cause de la présence d'un film d'eau intercalé entre le verre et la bicoche lipidique.

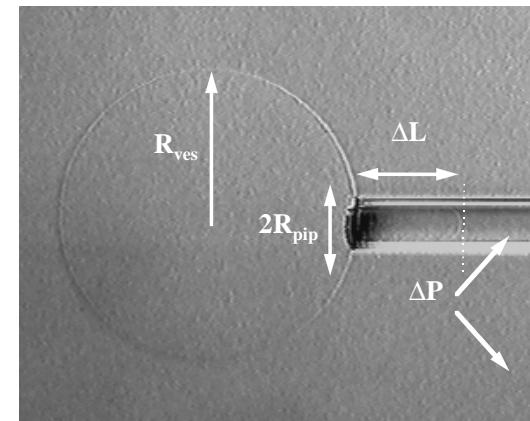


FIG. III.2.1: Image d'une vésicule aspirée dans une micropipette.

- La partie de la vésicule aspirée dans la micropipette est cylindrique et terminée par une calotte sphérique de rayon R_{pip} .
- La déformation imposée par l'aspiration est faible et la variation relative de surface $\Delta A/A$ reste inférieure à 10 %.

Nous supposerons que ces diverses approximations sont valides dans nos expériences. Une discussion détaillée de la validité de ces approximations a été proposée récemment [Drury and Dembo, 1999].

La différence de pression ΔP entre l'extérieur et l'intérieur de la micropipette est reliée à la tension par la loi de Laplace. On trouve, avec les approximations faites ci-dessus :

$$\sigma = \frac{R_{pip}}{2(1 - R_{pip}/R_{ves})} \Delta P. \quad (\text{III.2.1})$$

Des arguments géométriques simples montrent que l'on peut développer la variation de surface $(A_{asp} - A_0)/A_0$, entre la situation où la vésicule est aspirée dans la micropipette et celle où la vésicule fluctue librement avant aspiration, en fonction de la longueur ΔL d'aspiration de la membrane. Au premier ordre et toujours en utilisant les approximations vues plus haut, on trouve [Kwok and Evans, 1981] :

$$\frac{A_{asp} - A_0}{A_0} = \frac{(R_{pip}/R_{ves})^2 - (R_{pip}/R_{ves})^3}{2R_{pip}} \Delta L.$$

L'excès de surface $\alpha = (A - A_p)/A$ d'une membrane fluctuante est donné par l'équation I.1.10 (p. 15) :

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma + \kappa\pi^2/a^2}{\sigma + \kappa\pi^2/L^2}, \quad (\text{III.2.2})$$

où a est une distance microscopique et L la taille caractéristique de la membrane, ici $L = R_{ves}$. Lorsque la vésicule est libre, sa tension σ_0 est minimale et l'excès de surface α_0 est maximal. Lorsque la vésicule est aspirée dans la micropipette, sa tension augmente $\sigma > \sigma_0$, son excès de surface diminue $\alpha < \alpha_0$. La variation de surface $(A_{asp} - A_0)/A_0 > 0$ récupérée dans la pipette est donc reliée à la variation de l'excès de surface : $\alpha_0 - \alpha = (A_{asp} - A_0)/A_0 > 0$. On a donc :

$$\alpha_0 - \alpha = \frac{(R_{pip}/R_{ves})^2 - (R_{pip}/R_{ves})^3}{2R_{pip}} \Delta L. \quad (\text{III.2.3})$$

Expérimentalement, nous pouvons facilement avoir accès aux deux paramètres ΔP et ΔL . Connaissant le rayon de la vésicule et celui de la micropipette, on peut en déduire la tension σ et la variation de l'excès de surface $\alpha_0 - \alpha$. L'équation III.2.2 nous permet d'exprimer $\alpha_0 - \alpha$ en fonction de σ . Comme nous l'avons remarqué au paragraphe I.1.2, on a toujours $\kappa\pi^2/L^2 \ll \sigma \ll \kappa\pi^2/a^2$, même pour des vésicules très peu tendues ($\sigma_0 \simeq 10^{-7}$ N/m), donc $\alpha_0 - \alpha = kT/8\pi\kappa \ln(\sigma/\sigma_0)$. Si l'aspiration par la micropipette est suffisante pour provoquer une extension élastique de la membrane, on ajoute l'excès de surface $\Delta A/A = \sigma/\chi$ (voir Eq. I.1.11, p. 16). On obtient finalement la relation suivante entre $\alpha_0 - \alpha$ et σ [Evans and Rawicz, 1990] :

$$\alpha_0 - \alpha = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma}{\sigma_0} + \sigma/\chi. \quad (\text{III.2.4})$$

Lorsque l'on applique une tension croissante dans la membrane par l'intermédiaire de la micropipette, on voit d'après l'équation III.2.4 qu'aux faibles tensions, le terme logarithmique domine indiquant que l'on 'déplie' les fluctuations de la membrane. Si la tension devient forte, le terme linéaire domine et on étire élastiquement la membrane en augmentant la distance moyenne entre molécules de lipide. Si on trace $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$, on doit observer deux régimes : aux faibles tension, un comportement linéaire de pente $8\pi\kappa/kT$; aux tensions élevées une déviation logarithmique par rapport à ce comportement linéaire. La figure III.2.2 donne un exemple de mesure de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ obtenue à partir d'une vésicule purement lipidique. On observe bien les deux régimes attendus. Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement au régime des faibles tensions, dominé par les fluctuations de forme de la vésicule.

III.2.1.2 Montage expérimental

Le but des expériences de micropipettes est de permettre de comparer l'excès de surface d'une vésicule donnée lorsque la BR est activée à l'excès de surface de la même vésicule lorsque la BR n'est pas active. Le tracé du logarithme de la tension en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ aux faibles déformations nous permettra d'effectuer cette comparaison. Il faut donc être capable de mesurer ΔL et ΔP , sur la même vésicule éclairée en jaune (BR active) et en rouge (BR passive), pour des pressions croissantes. On doit aussi mesurer la fluorescence de la vésicule pour avoir une indication sur la densité de BR présente dans la membrane (voir §III.1.4.3). Le montage est directement inspiré du montage classique de micropipettes développé par E. Evans (UBC,

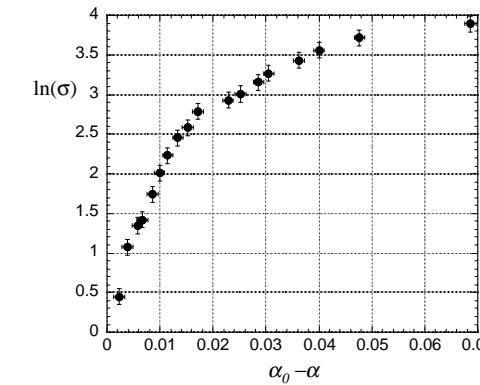


FIG. III.2.2: Exemple de variation du logarithme de la tension $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$, où $\alpha_0 - \alpha$ est la variation d'excès de surface.

Vancouver, Canada). Il est présenté sur les figures III.2.3 et III.2.4. L'ensemble est placé sur une table optique (07 OTN 501, Melles-Griot) anti-vibrations pour éviter toute perturbation mécanique des expériences. Les différentes parties du montage sont détaillées ci-dessous.

Fabrication et micromanipulation des micropipettes

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de 1 mm de diamètre (borosilicate GC 100T-10, Phymep) par une étireuse automatique (P-97, Sutter Instruments Co.). On obtient des micropipettes de diamètre inférieur au micron trop fines pour pouvoir aspirer des vésicules géantes. On les recoupe donc, à l'aide d'une microforge, à un diamètre plus grand, de l'ordre de 5 – 10 μm . La micropipette est ensuite remplie par capillarité d'une solution de glucose et de BSA (*Bovine Serum Albumin*) pendant 20 – 30 minutes. La BSA s'adsorbe sur le verre de la pipette et limite l'adhérence de la membrane lipidique sur le verre. La micropipette est tenue par un porte-pipette positionné à l'extrémité d'un micromanipulateur qui permet de déplacer la micropipette dans les trois directions à l'aide de microdéplacements manuels et piézoélectriques (Physik Instrumente).

Contrôle et mesure de la pression ΔP

Une différence de hauteur d'eau permet d'imposer la pression et d'aspirer la vésicule. La micropipette est reliée à un récipient d'eau pouvant se déplacer en hauteur par rapport à un récipient de référence (voir Fig. III.2.4). La différence minimale de hauteur d'eau que l'on peut

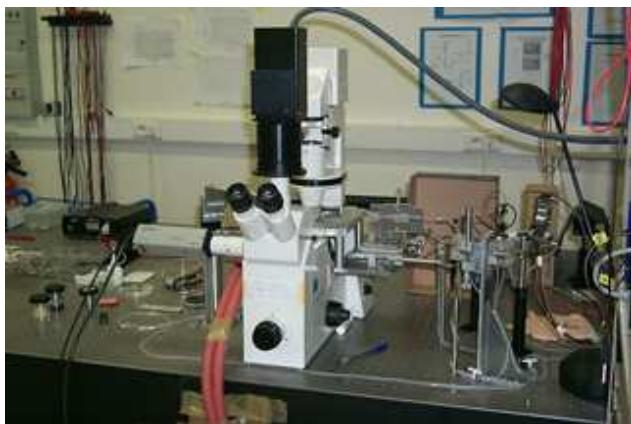


FIG. III.2.3: Photographie d'ensemble du montage expérimental.

imposer est de $1\text{ }\mu\text{m}$, ce qui correspond à une pression de 0.1 Pa . La différence de pression entre la pression à l'intérieur de la micropipette et la pression du récipient de référence est mesurée par un capteur de pression liquide/liquide à membrane métallique (DP103-20, Validyne, SEI3D). Sous l'effet d'une différence de pression, la membrane se déplace. Ce déplacement de la membrane dans un champ magnétique induit un courant et le capteur délivre une différence de potentiel proportionnelle à la différence de pression. La lecture de la pression se faisant à 0.1 mV près, on obtient la pression à 0.01 Pa près après étalonnage.

Visualisation des vésicules et déroulement des expériences

Le montage est réalisé sur un microscope inversé (Axiovert 135, Zeiss) équipé d'optiques pour le contraste de phase, le contraste interférentiel (Normaski ou DIC pour *Differential Interference Contrast*) et la fluorescence. Les techniques de contraste de phase et de contraste interférentiel sont classiques et ne seront pas décrites ici (voir par exemple [Péré, 1994]). Le montage utilisé pour la fluorescence a été détaillé au paragraphe III.1.4.3. Les vésicules sont placées dans une chambre de manipulation montée sur la platine du microscope. L'épaisseur de la chambre est de 1 mm . Le fond de la chambre est fermé par une lamelle de verre, alors que les côtés sont ouverts pour laisser passer la micropipette. Pour limiter l'évaporation de la solution de glucose dans laquelle se trouvent les vésicules, la chambre est thermostatée à $15 - 16^\circ\text{C}$, température proche du point de rosée de l'eau sous pression atmosphérique normale. Le contrôle de la température est assuré par une circulation d'eau refroidie par un bain thermostaté (RC20, MGW Lauda) et pompée jusqu'à la chambre de manipulation par une pompe péristaltique (Ismatec).

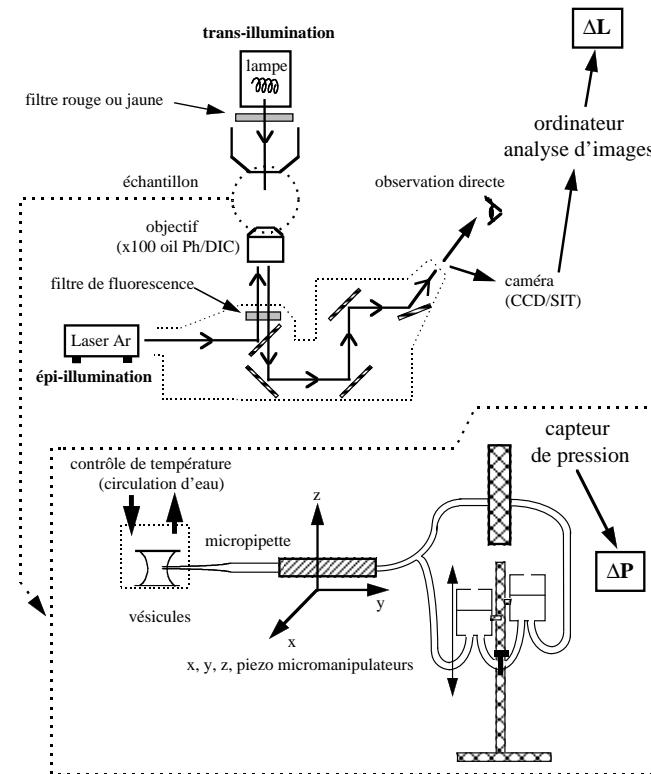


FIG. III.2.4: Schéma du montage de micropipettes.

L'éclairage en transmission par une lampe halogène (100 W) est utilisé à la fois pour visualiser les vésicules en contraste de phase ou en DIC et pour activer (resp. ne pas activer) la BR en plaçant un filtre jaune (resp. rouge) sur le trajet lumineux (voir Fig. III.1.13, P. 160). On se sert du contraste de phase pour sélectionner la vésicule car il permet une meilleure visualisation de ses éventuels défauts (vésicule accrochée à une autre ou au substrat, petites vésicules emprisonnées dans la vésicule principale...). En revanche, le contraste de phase ne permet pas visualiser la vésicule à l'intérieur de la micropipette, à cause des réflexions sur le verre de la pipette. On dispose d'un objectif x40 (N.A. 0.75 air Ph2 Plan Neofluar, Zeiss) qui permet de travailler à la fois en contraste de phase et en DIC. Une fois la vésicule sélectionnée, on passe en DIC pour l'aspirer dans la micropipette. Les images sont capturées par une caméra CCD (HyperHAD, Sony) et un traitement d'image permet de mesurer la longueur ΔL de membrane entrée dans la pipette au cours de l'aspiration. La durée totale nécessaire pour mesurer ΔL en fonction de ΔP sur une dizaine de points expérimentaux est courte, de l'ordre de 5 minutes, et identique d'une expérience à l'autre.

Pour vérifier la fluorescence des vésicules, le faisceau d'un laser Argon suit le trajet en réflexion et excite la fluorescence de la BR marquée au FITC, comme cela a été décrit au paragraphe §III.1.4.3.

III.2.1.3 Problèmes expérimentaux

Pour réaliser une expérience de micropipettes dans de bonnes conditions, il faut que plusieurs impératifs soient respectés au cours des différentes étapes de la manipulation.

Fabrication des micropipettes

La pipette doit être coupée droite et sans éclats pour que la vésicule aspirée forme un contact étroit avec le verre. Si le contact entre la vésicule et la micropipette n'est pas bon, un écoulement d'eau se crée entre la membrane et le verre. Ce problème est facile à déceler car, dans la plupart des cas, le flux hydrodynamique met en rotation la vésicule dans son ensemble et induit des écoulements à l'intérieur de la vésicule visualisés par le déplacement de petites particules dans la solution.

Le traitement des micropipettes à la BSA est indispensable pour éviter l'adhérence des lipides sur le verre. Son efficacité est cependant limitée si la même pipette est utilisée pour de nombreuses expériences successives. La quantité de BSA adsorbée n'est pas très bien contrôlée ; en général, la solution de glucose contient 1 % (en masse) de BSA et le traitement est effectué pendant 20 – 30 minutes. Une fois la pipette installée sur le micromanipulateur, puis placée dans la solution contenant les vésicules, on la rince en aspirant le milieu dans lequel sédimentent les vésicules. Pour éviter d'aspirer des vésicules, il suffit de placer la micropipette suffisamment haut dans la préparation. Ceci permet d'éviter d'éventuelles différences de pression osmotique entre l'intérieur

et l'extérieur de la pipette.

Contrôle de la pression ΔP

La présence de bulles d'air dans le système de contrôle de pression doit être absolument évitée sous peine de dérives, d'oscillations ou de phénomènes d'hystérésis dans la mesure de ΔP . Les bulles les plus traîtres se cachent dans le capteur de pression ou dans le porte-pipette. L'utilisation d'eau dégazée diminue les risques.

L'étalonnage du capteur de pression dépend de l'inclinaison de celui-ci. Il doit donc être refait systématiquement après démontage et nettoyage du capteur. Le coefficient de proportionnalité entre la tension délivrée et la différence de pression varie cependant très peu et n'est pas une source d'erreur significative.

Visualisation et manipulation des vésicules

Après leur transfert de la chambre de fabrication vers la chambre de manipulation (voir §III.1.3), les vésicules se retrouvent sous tension et très peu fluctuantes. On laisse donc la préparation à température ambiante pendant 15 – 30 minutes pour que la solution externe de glucose s'évapore légèrement et se concentre. La différence de pression osmotique ainsi créée entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule dégonfle légèrement la vésicule par fuite passive d'eau à travers la membrane. Le volume interne de la vésicule diminue et celle-ci devient fluctuante. On met ensuite en marche le thermostat à 15 – 16 °C pour cesser l'évaporation et éviter les flux hydrodynamiques. Malgré cela, une recirculation lente subsiste, vraisemblablement convective, et rassemble les vésicules au centre de la préparation, où le flux dans le plan horizontal est négligeable. On choisit donc une vésicule puis on effectue l'expérience d'aspiration dans cette zone sans écoulement.

Le choix de la vésicule est important. La vésicule doit être bien fluctuante, sans défaut à l'intérieur (vésicules plus petites, saletés, amas lipidiques etc...), et accrochée ni à la lame de verre ni à d'autres vésicules. Le diamètre de la vésicule doit être 3 à 4 fois plus grand que celui de la micropipette : trop petit, on ne pourra pas avoir accès au régime des faibles déformations (voir Eqs. III.2.1 et III.2.3) ; trop grand, les contraintes sur la vésicule à l'extrémité de la micropipette sont trop importantes et provoquent sa rupture à faible tension. Enfin, la vésicule doit être unilamellaire. Pour cela, la membrane doit apparaître 'fine' en contraste de phase, et l'intensité relative de fluorescence ne doit pas être anormalement élevée (voir §III.1.4.3).

Pour comparer le comportement de la vésicule lorsque la BR est active par rapport au cas où elle est passive, il faut pouvoir aspirer la vésicule au moins deux fois de suite, en changeant le filtre utilisé (jaune pour activer la BR, rouge pour ne pas l'activer). Effectuer des aspirations successives sur la même vésicule n'est pas évident pour plusieurs raisons. L'étirement de la vésicule la fragilise et peut aboutir à sa rupture : on a donc veillé à ne pas trop déformer les

vésicules pour rester dans le régime de faible tension. Malgré le traitement de la pipette à la BSA, les expériences ne sont parfois pas strictement réversibles, et, surtout lorsque la différence de pression est diminuée, la membrane ne glisse pas parfaitement sur le verre. Les expériences ont donc pour la plupart été réalisées par aspiration des vésicules en augmentant progressivement la différence de pression. Au bout de plusieurs aspirations de la même vésicule ou bien si la micropipette a été trop longtemps utilisée, la vésicule, après avoir été relâchée, est souvent reliée à la pipette par un filament lipidique. La seule solution est alors de changer de pipette.

Les bandes passantes des filtres rouge et jaune sont différentes (voir Fig. III.1.13, P. 160) : à puissance maximale de la lampe halogène du microscope, le filtre rouge coupe beaucoup plus la lumière ($I \simeq 85$ mW au point de convergence du condenseur, correspondant à une surface d'environ 1 cm^2 lorsque le diaphragme de champ est ouvert au maximum) que le filtre jaune ($I \simeq 225$ mW). Lors de l'aspiration en lumière rouge, l'intensité de la lampe halogène doit être maximale pour une bonne visualisation de la membrane dans la micropipette, d'autant plus que la réponse spectrale caméra diminue dans le rouge. En revanche, lorsque le filtre jaune est utilisé, il faut diminuer l'intensité pour éviter la saturation de la caméra CCD et retrouver sensiblement les mêmes niveaux de gris que lors de l'expérience en lumière rouge. En lumière rouge comme en lumière jaune, l'intensité reçue au niveau de l'échantillon est donc de l'ordre de 100 mW pour une surface d'environ 1 cm^2 , soit une puissance reçue par unité de surface de 10^3 W/m^2 du même ordre de grandeur que la puissance connue pour activer la BR à saturation dans les LUVs (voir §III.1.4.2).

Enfin, la mesure de l'intensité de fluorescence I_F est délicate. Une fois l'expérience d'aspiration terminée, on change de caméra pour utiliser la caméra SIT nécessaire à l'obtention d'images à faible niveau de fluorescence. On s'assure que le couplage du laser Argon au microscope est identique d'une expérience à l'autre en mesurant, à l'aide d'une photorésistance, l'intensité à la sortie de la fibre optique assurant ce couplage. La puissance du laser et le gain de la caméra SIT sont aussi maintenus constants. On suppose que le phénomène de photoblanchissement du FITC dû à l'éclairage des vésicules en transmission lors des expériences d'aspiration est négligeable. En revanche, le photoblanchissement dû au laser Argon est assez rapide : il faut donc quantifier la fluorescence à partir des premières images obtenues juste après l'ouverture du faisceau laser.

III.2.2 Résultats

Nous avons tout d'abord testé notre technique de micropipette sur le cas de vésicules purement lipidiques pour retrouver la valeur connue du module de courbure d'une bicouche d'EPC : $\kappa \simeq 10\text{ kT}$. Nous avons ensuite cherché à savoir si l'incorporation de la BR modifie les propriétés élastiques de la bicouche d'EPC. Enfin, nous avons étudié l'effet de l'activité de pompage de la BR sur les expériences de micropipettes.

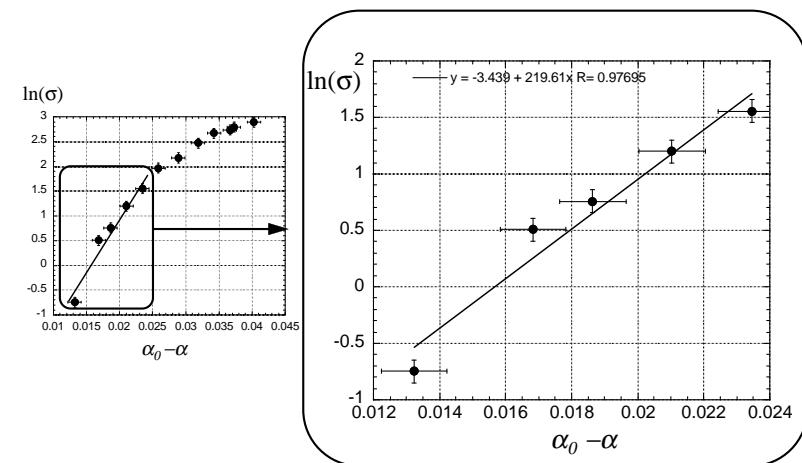


FIG. III.2.5: Graphe de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ obtenu pour une vésicule d'EPC et ajustement linéaire aux faibles tensions qui permet de déduire la pente $8\pi\kappa/kT$.

III.2.2.1 Vésicules purement lipidiques

Le tracé du logarithme de la tension $\ln \sigma$ en fonction de la variation d'excès de surface $\alpha_0 - \alpha$ permet de déterminer le module de courbure κ par un ajustement linéaire aux faibles déformations (voir Eq. III.2.4). La pente de la droite est proportionnelle à $8\pi\kappa/kT$. On peut donc en déduire directement la valeur de κ en fonction de $kT = 4 \times 10^{-21}\text{ J}$ à $T = 15 - 16^\circ\text{C}$.

La figure III.2.5 montre un exemple typique de courbe représentant $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$. Le nombre de points dans le régime linéaire des faibles tensions est faible, de 5 à 10 dans les meilleurs cas. Le tout premier point est en général très imprécis, car il dépend du choix de α_0 . On ne peut pas connaître la tension σ_0 et l'excès de surface α_0 de la vésicule libre avant aspiration. L'astuce est donc de définir la situation de référence comme celle où la vésicule vient tout juste d'être aspirée dans la micropipette [Evans and Rawicz, 1990]. La plus petite pression P_0 permettant d'aspirer une longueur L_0 de membrane dans la micropipette définit le point de référence α_0 . Tous les points de la courbe sont ensuite mesurés par rapport à cette référence : $\Delta L = L - L_0$ et $\Delta P = P - P_0$. Pour les derniers points de la courbe, il faut éviter d'inclure des points se trouvant déjà dans le régime de déformation élastique, ce qui diminue fortement la valeur de κ . L'ajustement linéaire d'une courbe donnée comporte donc certaines imprécisions inhérentes à la technique même de micropipettes. Pour obtenir un résultat valable, il est nécessaire d'accumuler un grand nombre d'expériences sur des vésicules différentes.

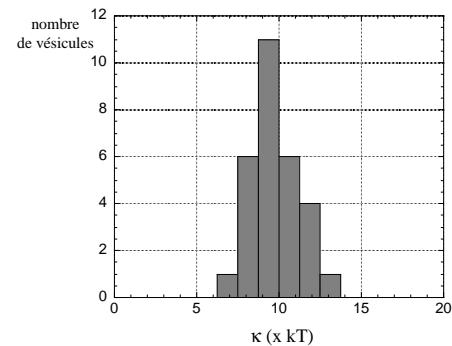


FIG. III.2.6: Distribution des valeurs du module de courbure κ pour 29 vésicules purement lipidiques.

La formation de vésicules constituées uniquement de lipides EPC ne pose pas de problème particulier. Les expériences de micropipette sont aussi facilitées par le fait qu'une seule aspiration par vésicule suffit pour déterminer le module de courbure. On dispose donc d'une statistique importante (voir Fig. III.2.6). Pour 29 expériences indépendantes, on trouve une valeur moyenne de $\kappa = 9.9 \pm 0.3 kT$ (erreur standard $\sqrt{\sigma^2}/\sqrt{N}$ où σ^2 est la variance et N est le nombre d'expériences indépendantes) égale à la valeur couramment admise dans la littérature pour la bicouche d'EPC (voir §I.3.1.5 et Tab. I.3.2). Pour certaines vésicules, on trouve un module de courbure environ deux fois plus élevé : les vésicules concernées, souvent plus contrastées sur les images de contraste de phase, sont certainement bilamellaires et ne sont pas prises en compte dans la statistique de la figure III.2.6.

Nous avons montré que la pente de la courbe $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ n'est pas modifiée selon que les vésicules sont éclairées en jaune ou en rouge (voir Fig. III.2.7). Malgré les imprécisions supplémentaires dues à la nécessité d'effectuer deux aspirations successives sur la même vésicule, aucun changement de pente significatif n'a pu être mis en évidence. La pente est proportionnelle à κ/T . Le module de courbure étant une propriété élastique de la membrane, il ne dépend *a priori* pas de la longueur d'onde utilisée. En revanche on peut quantifier un éventuel effet du changement de longueur d'onde par une variation de la ‘température’ effective de la membrane. En effet, si on suppose que les lipides absorbent différemment la lumière dans la jaune et dans le rouge, on peut s'attendre à un échauffement de la membrane différent. Nous avons donc mesuré le changement relatif de température effective $\Delta T/T = (T_{jaune} - T_{rouge})/T_{rouge}$ pour une même vésicule éclairée successivement en rouge puis en jaune (ou bien en jaune puis en rouge). Une moyenne sur 14 expériences indépendantes donne : $\Delta T/T = 0.018 \pm 0.095$, donc aucun effet n'a

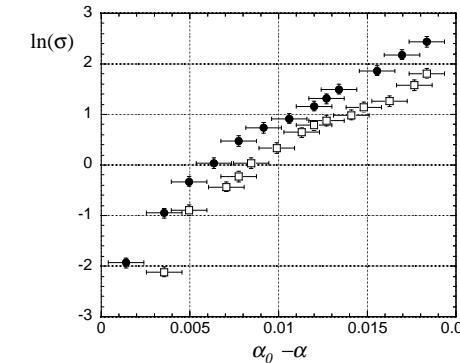


FIG. III.2.7: Exemple de graphe de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ pour une vésicule purement lipidique éclairée en rouge (cercles pleins) et en jaune (cercles vides).

pu être mis en évidence selon que les vésicules purement lipidiques sont éclairées en jaune ou en rouge

III.2.2.2 Effet de l'incorporation de la bactériorhodopsine

Nous avons ensuite cherché à savoir si la valeur du module de courbure est modifiée par la présence de BR dans la bicouche. Pour cela, nous avons effectué des expériences de micropipette sur des vésicules géantes dont la membrane contient de la BR (voir §III.1.4.3). Les vésicules sont éclairées en lumière rouge et le photocycle de la BR n'est donc pas activé. La densité de BR dans la membrane est proportionnelle à l'intensité relative de fluorescence $I_F = \Delta F/F$. Comme on peut le constater sur la figure III.2.8, aucun changement significatif de la valeur de κ , à la précision des expériences de micropipette près, n'a pu être mis en évidence lorsque la densité de BR augmente.

Là encore, on a clairement pu faire la distinction entre vésicules unilamellaires et multilamellaires : une intensité de fluorescence anormalement élevée (de l'ordre de $I_F \simeq 1.6 - 2$) et une valeur de κ de l'ordre de $16 - 20 kT$ signe la présence d'une vésicule bilamellaire. Nous n'avons donc pas tenu compte de ces vésicules dans nos analyses.

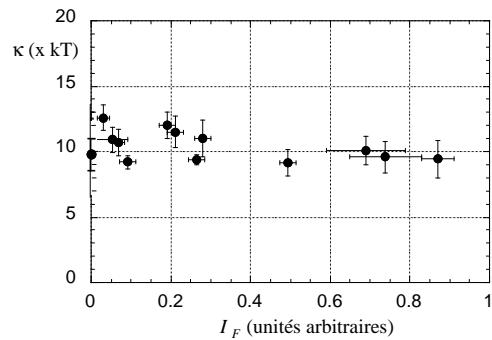


FIG. III.2.8: Evolution du module de courbure en fonction de l'intensité de fluorescence I_F pour des vésicules contenant de la BR éclairées en rouge.

III.2.2.3 Effet de l'activité de pompage de la BR

Pour tester l'effet du pompage de la BR, nous avons aspiré successivement la même vésicule en lumière rouge (membrane passive) puis en jaune (membrane active), ou bien en lumière jaune (membrane active) puis en rouge (membrane passive). Les expériences sont ici plus délicates car les vésicules contenant de la BR semblent plus ‘fragiles’ que des vésicules purement lipidiques. Les comportements pathologiques lors de la deuxième aspiration sont plus fréquents.

La figure III.2.9 donne un exemple typique de courbe d'apiration obtenue en lumière rouge puis en jaune. Le même résultat est obtenu si la séquence d'éclairage est inversée. Dans le cas actif, tout comme dans le cas passif, la courbe peut être correctement ajustée par une droite. On voit cependant une nette différence de pente : lorsque la BR pompe (en lumière jaune), la pente est environ deux fois plus faible que lorsqu'elle ne pompe pas (en lumière rouge). La figure III.2.10 illustre ce changement de pente pour une dizaine de vésicules de densité en BR variable.

Nous utiliserons ici la notion de température effective pour quantifier le changement de pente observé dans les expériences de micropipette. Ceci est justifié par le fait que les données peuvent être ajustées de façon linéaire aussi bien dans le cas actif que dans le cas passif. La pente du graphe de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ est proportionnelle à κ/T . L'expérience passive en lumière rouge permet de déterminer le module de courbure de la membrane κ (en unité kT). Pour l'expérience active en lumière jaune, la pente de la droite obtenue définit une température effective T_{eff} de la membrane. Une diminution de la pente correspond donc à une augmentation de la température effective. Pour chacune des expériences de la figure III.2.10, on a donc calculé $\Delta T/T = (T_{eff} - T)/T > 0$ et porté $\Delta T/T$ en fonction de l'intensité relative de fluorescence

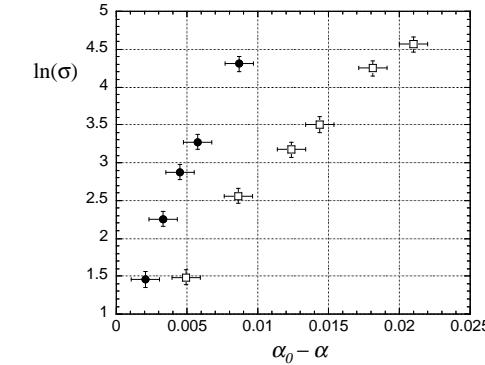


FIG. III.2.9: Exemple de graphe de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ pour une vésicule contenant de la BR éclairée en rouge (cercles pleins) et en jaune (cercles vides).

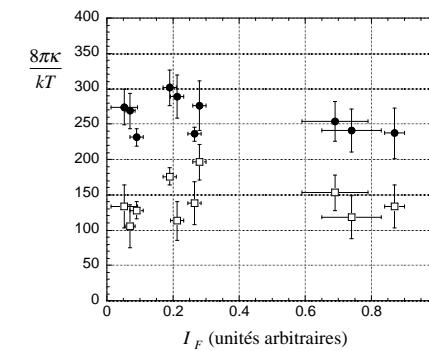


FIG. III.2.10: Changement de la pente $8\pi\kappa/kT$ des graphes de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ pour dix vésicules contenant de la BR et d'intensité de fluorescence I_F variable.

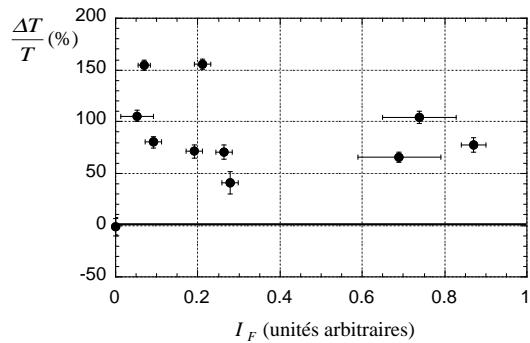


FIG. III.2.11: Variation relative de température effective $\Delta T/T = (T_{eff} - T)/T$ (en %, pour les vésicules de la figure précédente).

I_F (voir Fig. III.2.11). Les valeurs sont assez dispersées et aucune dépendance avec l'intensité de fluorescence ne peut être clairement dégagée. On observe un changement relatif de l'ordre de près de 100% correspondant à un doublement de la température effective. Puisque ces résultats semblent dépendre faiblement de la densité de BR présente dans la membrane, nous avons effectué la moyenne du changement de température effective. On trouve un changement relatif de température de : $\Delta T/T = 0.927 \pm 0.119$. Pour des vésicules contenant de la BR, on observe donc un fort effet lors du changement de lumière utilisée pour éclairer la BR. Il s'agit du principal résultat de ces expériences de micropipettes et nous l'interpréterons au paragraphe III.2.3. Dans les paragraphes suivants, nous allons étudier les conséquences de la modification de différents paramètres expérimentaux sur l'effet observé ci-dessus.

Modulation par la force ionique

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la force ionique sur les résultats précédents. Si un pompage net de protons a lieu, une différence de pH et de potentiel électrique s'établit entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule pouvant inhiber l'activité de la BR (voir §III.1.4.2). De plus si l'effet observé est de nature électrostatique, la force ionique intervient via la longueur de Debye.

La technique d'électroformation ne permet pas de former des vésicules en milieu très salé (voir §III.1.3). Nous avons réussi à obtenir des GUVs jusqu'à des concentrations de 2 mM de sels potassiques KCl ou K_2SO_4 (voir annexe A). La valinomycine, ionophore potassique utilisé dans le cas des LUVs, est connu pour affecter considérablement les propriétés mécaniques de la membrane

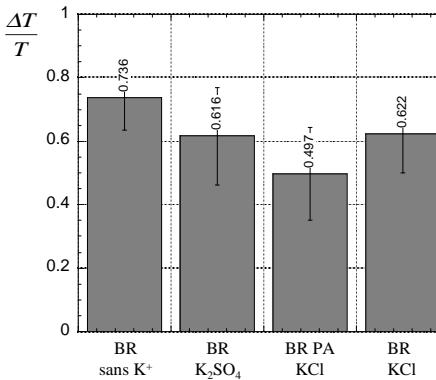


FIG. III.2.12: Effets électrostatiques. Changement relatif de température effective $\Delta T/T = (T_{eff} - T)/T$ dans les cas suivants : vésicules contenant de la BR dans un milieu sans ion K^+ (5 expériences) ; vésicules contenant de la BR dans un milieu salé par 2 mM de K_2SO_4 (5 expériences) ou de KCl avec (5 expériences) ou sans (7 expériences) lipides chargés (EPA).

de vésicules géantes (voir §I.3.1.5) : la valeur du module de courbure d'une bicouche diminue de près d'un facteur 2 après addition de 1% (molaire) de valinomycine [Häckl et al., 1997]. Pour éviter de compliquer le système et l'interprétation des résultats, nous avons donc simplement ajouté 2 mM de KCl ou K_2SO_4 sans valinomycine. Le chlorure de potassium KCl présente l'intérêt de pouvoir ‘débloquer’ la BR inhibée par un gradient électrique de protons sans incorporation d'ionophore potassique (voir §III.1.4.2 et Fig. III.1.17). Nous avons aussi formé des vésicules contenant 10% de lipides chargés négativement EPA. La BR s'incorpore bien en présence d'EPA : on obtient même des GUVs un peu plus facilement que dans le cas de lipides EPC seuls.

Pour tester l'effet de l'activité en présence de sel, nous avons comparé les résultats d'expériences effectuées en parallèle dans les différentes conditions expérimentales suivantes : vésicules contenant de la BR dans un milieu sans ion K^+ , vésicules contenant de la BR dans un milieu salé par 2 mM de K_2SO_4 ou de KCl avec ou sans lipides chargés (EPA). En lumière rouge, le module de courbure reste voisin de $10 kT$ et en lumière jaune, comme en l'absence de sel, la pente de la droite $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ est plus faible. Comme précédemment, le changement de pente dépend peu de la concentration en BR. En moyennant la variation de température effective $\Delta T/T$, on obtient : $\Delta T/T = 0.736 \pm 0.101$ en milieu non salé (5 expériences indépendantes), $\Delta T/T = 0.622 \pm 0.123$ pour KCl 2 mM (7 expériences indépendantes), $\Delta T/T = 0.616 \pm 0.153$ pour K_2SO_4 2 mM (5 expériences indépendantes) et $\Delta T/T = 0.497 \pm 0.146$ pour le mélange EPC/EPA (9/1) en présence de 2 mM de KCl (5 expériences indépendantes). L'effet du pom-

page de la BR en milieu salé ou en présence de lipides chargés EPA est donc légèrement plus faible qu'en milieu non salé, mais pas de façon vraiment significative au vu du faible nombre d'expériences effectuées ici (voir Fig. III.2.12). Dans la suite, toutes les expériences ont été réalisées en présence de 2 mM de KCl.

Modulation par addition de glycérol : viscosité du milieu et perméabilité de la membrane

Comme nous l'avons souligné à la fin de l'introduction (voir §I.3.4.2), l'influence de la viscosité permet de distinguer une situation à l'équilibre thermodynamique (où la viscosité ne joue aucun rôle) d'une situation hors équilibre (où la viscosité peut jouer un rôle).

Nous avons essayé de modifier la viscosité de plusieurs façons, par exemple en utilisant des solutions de sucre concentrées (410 mM de sucrose pour $\eta = 1.5\eta_{eau}$, 700 mM de sucrose pour $\eta = 2\eta_{eau}$) ou bien par addition de polymères (PEO *PolyEthylene Oxyde* 1% pour $\eta = 2\eta_{eau}$). Mais aucune de ces deux méthodes n'a aboutit à la formation de GUVs utilisables dans les expériences de micropipettes. En revanche, l'addition de glycérol (voir annexe A) ne perturbe pas trop l'électroformation des GUVs. Nous avons observé que, pour être efficace, l'électroformation en milieu visqueux doit se faire à basse fréquence (5 Hz). L'addition de 16% (en masse) de glycérol donne une viscosité une fois et demie plus grande que celle de l'eau $\eta = 1.5\eta_{eau}$. Une viscosité double de celle de l'eau, $\eta = 2\eta_{eau}$, est obtenue en ajoutant 25% (en masse) de glycérol, mais la formation de GUVs est alors plus lente et difficile. Le glycérol est présent en concentration égale dans le milieu de formation des vésicules à base de sucrose, donc à l'intérieur des vésicules, et aussi dans le milieu extérieur à base de glucose. La viscosité est donc la même à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule, ce qui facilitera l'interprétation des résultats.

En présence de glycérol (16 et 25 %), le module de courbure de la bicoche d'EPC reste égal à $10kT$, comme le prouvent les expériences de micropipettes en lumière rouge. Lorsque les vésicules sont éclairées en lumière jaune, on observe encore une diminution de la pente, mais moins forte qu'en l'absence de glycérol. On observe donc une nette diminution de l'effet de l'activité de la BR lorsque la concentration en glycérol augmente. La variation de température effective moyennée sur plusieurs expériences vaut : $\Delta T/T = 0.620 \pm 0.091$ (12 expériences) sans glycérol ($\eta = \eta_{eau}$) (voir ci-dessus), $\Delta T/T = 0.365 \pm 0.045$ (15 expériences) avec 16% de glycérol ($\eta = 1.5\eta_{eau}$) et $\Delta T/T = 0.200 \pm 0.040$ (10 expériences) avec 25% de glycérol ($\eta = 2\eta_{eau}$). La figure III.2.13 illustre la diminution de l'effet du pompage par ajout de glycérol.

Nous verrons, lors de l'interprétation de ces expériences, que l'addition de glycérol entraîne non seulement une augmentation de la viscosité du milieu, mais qu'il peut aussi avoir un effet sur le coefficient de perméation λ_p de la bicoche d'EPC et peut-être sur le fonctionnement de la BR.

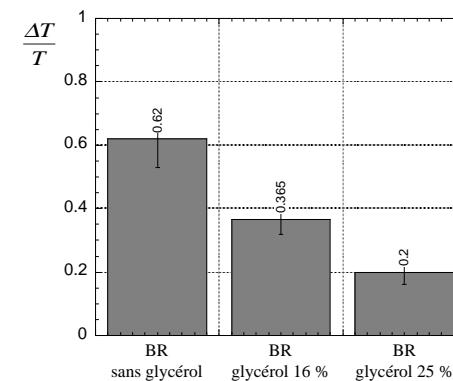


FIG. III.2.13: Effets de l'addition de glycérol. Changement relatif de température effective $\Delta T/T = (T_{eff} - T)/T$ dans les cas suivants : vésicules contenant de la BR dans un milieu salé (K_2SO_4 ou KCl, soit 12 expériences) ; vésicules dans le même milieu dans lequel 16% de glycérol ont été ajoutés (15 expériences) ; vésicules dans le même milieu dans lequel 25% de glycérol ont été ajoutés (10 expériences) .

III.2.3 Interprétation et discussion

Les résultats précédents montrent que lorsque les vésicules sont éclairées en jaune, la pente du graphe de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ obtenu par les expériences de micropipettes est plus faible que lorsque les vésicules sont éclairées en rouge. On peut donc ‘tirer’ une surface de membrane plus importante quand les vésicules sont éclairées en jaune : l’excès de surface dû aux fluctuations est plus grand en lumière jaune qu’en lumière rouge. L’interprétation que nous proposons est la suivante : lorsque la lumière jaune éclaire les vésicules, la BR est active, pompe les protons, et joue le rôle de centre actif. On montre dans ces expériences que l’excès de surface est plus important quand la membrane est active et donc que l’activité augmente l’amplitude des fluctuations d’une membrane libre. Nous allons discuter cette interprétation dans les paragraphes ci-dessous.

III.2.3.1 Effet de l’incorporation de la BR

Il peut paraître surprenant que l’incorporation de la BR dans la bicouche d’EPC ne modifie pas significativement la valeur du module de courbure κ . On voit, d’après la figure III.2.8, que κ reste voisin de $10 kT$ indépendamment de l’intensité de fluorescence I_F . Comme nous l’avons déjà fait remarquer, l’intensité de fluorescence ne donne qu’une indication relative de la quantité de BR présente dans la membrane, mais on voit qu’elle varie de près d’un facteur dix entre les vésicules les moins fluorescentes et les vésicules les plus fluorescentes. Si une tendance générale devait se dégager, on devrait donc pouvoir l’observer.

Les études théoriques de l’influence de l’incorporation d’inclusions dans une bicouche lipidique prévoient une diminution du module de courbure si les inclusions sont en régime dilué et peuvent être considérées comme des impuretés (voir §I.3.2.2 et §III.3.1). On peut estimer l’effet prévu sur le module de courbure grâce à l’équation II.3.9 :

$$\kappa_{eff} = \kappa \left(1 - \frac{\bar{\rho} \Xi^2}{\kappa kT} \right).$$

En effet, on peut montrer que le coefficient de couplage Ξ entre la courbure de la membrane et la densité d’inclusions est relié à la taille des inclusions R_p et à l’angle du cône modélisant leur asymétrie θ par : $\Xi \simeq 2\kappa R_p \theta$ (voir Fig. III.2.16, p. 204) [Ramaswamy et al., 1999]. Si on suppose que la BR possède une forte asymétrie $\theta = 0.1$ rad et en prenant $R_p = R_{BR} \simeq 2$ nm pour la taille des inclusions (voir §III.1.2.1), on trouve $\Xi \simeq 1.6 \times 10^{-29}$ J.m et une variation du module de courbure de l’ordre de 1%. Avec les hypothèses de ce modèle, donc en régime suffisamment dilué, l’effet de l’incorporation de la BR sur le module de courbure devrait être négligeable.

Cependant, des expériences d’incorporation de petits peptides dans des membranes lipidiques ont permis de mettre en évidence une forte diminution du module de courbure [Duwe et al., 1990, Häckl et al., 1997, Méléard et al., 1998, Gerbeaud, 1998]. Nous avons vu au paragraphe §I.3.1.5 que des faibles quantités d’inclusions peuvent entraîner une réduction du module de courbure bien plus importante que l’estimation donnée ci-dessus (voir Tab. I.3.2). Ces résultats sont en général

interprétés comme étant la conséquence de modifications structurelles de la bicouche, par exemple un amincissement local ou la formation de pores en présence de ces peptides. Les études portant sur l’incorporation de protéines sont plus rares. Dans le cas de BR incorporée dans une bicouche de SOPC, une légère diminution de κ a été récemment observée [Gerbeaud, 1998]. La concentration de BR utilisée dans ces expériences varie entre 100 et 50 lipides/BR poids/poids, soit entre 3400 et 1700 lipides/BR. Dans nos expériences, le rapport dans le film d’électroformation est beaucoup plus faible de l’ordre de 80 lipides/BR : la quantité de BR incorporée dans les vésicules d’EPC doit donc être beaucoup élevée, même si toute la BR présente dans le film initial ne s’incorpore pas dans les vésicules (voir §III.1.4.3). La protéine ne peut alors plus être considérée comme une simple impureté dans la membrane.

Si la densité de BR dans la membrane est élevée, pourquoi sa présence ne modifie-t-elle pas les propriétés mécaniques de la membrane ? En fait, le lipide que nous utilisons dans nos expériences (EPC) est connu pour être bien adapté à la longueur des hélices transmembranaires de la BR et minimiser le décalage hydrophobe (*hydrophobic mismatch*, voir §I.3.2.2). Il a été montré que la présence de BR ne modifie pas la température de transition de phase d’une bicouche de glycérophosphocholine de longueur de chaîne en C16 (dipalmitoylglycérophosphocholine) de même longueur que la chaîne majoritairement présente dans l’EPC [Piknova et al., 1993]. Le fait que l’EPC soit constitué d’un mélange de plusieurs longueurs de chaîne hydrocarbonnée (surtout C16 et C18) pourrait aussi favoriser l’incorporation de la BR par un mécanisme de sélection moléculaire (*molecular sorting*, voir §I.3.2.2) [Dumas et al., 1997]. La présence de BR ne semble donc pas perturber la bicouche lipidique, ce qui peut expliquer pourquoi le module de courbure n’est pas modifié en présence de BR.

III.2.3.2 Effet de l’activité de pompage de la BR

Contrôle sur des vésicules purement lipidiques

L’augmentation de température effective lorsque les vésicules sont éclairées en jaune est observée uniquement pour des vésicules contenant de la BR dans la membrane. On ne peut donc pas attribuer l’effet observé aux seules molécules de lipides, qui pourraient par exemple subir une modification quelconque en fonction de la longueur d’onde de la lumière utilisée.

On peut se demander si l’effet observé ne pourrait pas être dû à différents artefacts dûs à un chauffage de la solution différent entre l’éclairage rouge et l’éclairage jaune, pouvant par exemple provoquer des mouvements de convection dans un cas et pas dans l’autre. On s’assure, lors des expériences, que l’intensité lumineuse reçue par l’échantillon est sensiblement la même lors des deux aspirations successives, de l’ordre de 10^3 W/m², puisque l’éclairage halogène en transmission du microscope est ajusté de façon à obtenir les mêmes niveaux de gris sur les images observées (voir §III.2.1.3). Le contrôle effectué avec des vésicules purement lipidiques permet de toutes façons d’éliminer définitivement de telles sources d’erreur dans nos expériences, puisqu’aucun effet n’est observé sur des vésicules purement lipidiques.

Effets thermiques liés à la présence de BR

Dans le même ordre d'idée, on peut se demander si ce n'est pas simplement l'absorption de photons jaunes par le rétinol qui chauffe localement la membrane et change ses propriétés élastiques. On va montrer ci-dessous par deux calculs d'ordre de grandeur différents que l'élévation de température due à l'absorption des photons est négligeable.

Cas stationnaire

On suppose qu'un régime stationnaire est atteint, où la BR absorbe un photon toutes les $\tau = 5$ ms. Le flux total reçu par unité de surface de membrane et par unité de temps est :

$$W = \frac{h\nu}{\tau} \times \rho,$$

où h est la constante de Planck, ν la fréquence des photons, et $\rho \simeq 10^{16} \text{ m}^{-2}$ est la densité de BR dans la membrane. Ce flux de chaleur reçu par la membrane est dissipé par conduction dans le milieu aqueux extérieur à la vésicule. Il apparaît donc un gradient de température ΔT entre la membrane chauffée par l'absorption de BR et la solution environnante refroidie par la circulation d'eau dans la chambre thermostatée. Ce gradient s'établit sur une distance typique de l'ordre de l'épaisseur de la chambre de manipulation $L = 1$ mm. En notant $C = 4.18 \times 10^6 \text{ J m}^{-3} \text{ K}^{-1}$ la capacité calorifique de l'eau et $K_T = 1.5 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ sa conductivité thermique, on a :

$$CK_T \frac{\Delta T}{L} = W = \frac{h\nu}{\tau} \times \rho,$$

d'où

$$\Delta T = \frac{h\nu}{\tau} \times \rho \times \frac{L}{CK_T}.$$

On en déduit une augmentation de température de l'ordre de $\Delta T = 2 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}$.

Cas non stationnaire

Avec les notations précédentes, $W \times t$ est l'énergie reçue par la membrane pendant le temps t . La distance sur laquelle la chaleur diffuse pendant la durée typique d'une expérience de micropipettes $t = 1000$ s est donnée par $L = \sqrt{K_T t} = 1$ cm. Cette distance est supérieure à l'épaisseur de la chambre de manipulation, mais nous supposerons quand même que la chaleur peut diffuser sur cette distance L pour obtenir l'échauffement le plus fort possible. On a alors :

$$W \times t = C \Delta T L,$$

d'où

$$\Delta T = \frac{h\nu}{\tau} \times \rho \times t \times \frac{1}{CL}.$$

On trouve alors un échauffement de : $\Delta T = 2 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}$.

Les propriétés élastiques de la membrane dépendent de la température. Le module de courbure κ augmente lorsque l'on approche de la température de transition des lipides. Pour l'EPC, la température de transition est de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$. La chambre de manipulation étant thermostatée autour

de $15-16 \text{ }^\circ\text{C}$, la température est suffisamment éloignée pour pouvoir négliger toute variation de κ . Enfin, le coefficient d'expansion thermique d'une bicouche d'EPC est de l'ordre de $2.4 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ [Kwok and Evans, 1981] : cette valeur ne permet pas d'expliquer l'effet observé, même en supposant des variations de température du thermostat de l'ordre de $1 \text{ }^\circ\text{C}$. On surestime l'échauffement local de la bicouche dû à l'absorption de la BR en supposant que la température augmente d'environ $0.1 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, soit un facteur 100 fois supérieur à l'estimation. D'après les ordres de grandeur précédents, les modifications des propriétés élastiques restent complètement négligeables.

Effets électrostatiques et influence de la force ionique

La membrane des vésicules dans laquelle la BR est reconstituée est chargée, puisque la BR possède plusieurs charges négatives (voir §III.1.2.1). On s'attend donc à une augmentation du module de courbure lors de l'incorporation de la BR puisque la contribution électrostatique au module de courbure est toujours positive (voir Eq. I.3.1, p. 66). L'incorporation de BR ne modifie pas la valeur de κ , ce qui suggère que les effets électrostatiques sont négligeables.

La diminution de pente $8\pi\kappa/kT$ du logarithme de la tension en fonction de la variation d'excès de surface dans le cas actif, que nous avons interprétée ci-dessus comme une augmentation de la température effective, pourrait *a priori* aussi être interprétée comme une diminution du module de courbure effectif causée par le pompage de protons. N'ayant pas observé de changement du module de courbure lié à l'incorporation de la BR, il serait étonnant que la translocation de protons modifie les propriétés électrostatiques de la membrane de façon plus significative, d'autant plus que toutes les études théoriques prévoient une augmentation de κ par des effets d'origine électrostatique. Cela semble confirmé par le fait que l'ajout de 10 % de charges négatives par l'addition d'EPA ne diminue que très légèrement l'effet du pompage.

Enfin, la variation de la force ionique par ajout de KCl ou de K_2SO_4 n'entraîne qu'une légère diminution de la variation de température effective $\Delta T/T$ (voir Fig. III.2.12), alors que la longueur d'onde de Debye passe de $\lambda_D = 9.6$ nm pour le milieu de sucre sans ions K^+ (on ajoute 1 mM d'azide pour éviter le développement des bactéries, voir annexe A) à $\lambda_D = 6.8$ nm (resp. $\lambda_D = 3.9$ nm) lorsqu'on ajoute 2 mM de KCl (resp. 2 mM de K_2SO_4). Si un gradient électrochimique de protons est établi lors du pompage à cause d'une asymétrie d'orientation de la protéine, la BR ne fonctionne pas à 100 %. On s'attend donc à ce que la présence de KCl dans le milieu permette de 'débloquer' d'éventuelles BR inhibées et que l'effet du pompage soit amplifié. L'absence d'effet de la force ionique suggère que le gradient électrique de protons est très faible et que l'incorporation de la BR dans la bicouche est presque symétrique. Ce résultat semble confirmé par des études préliminaires ne mettant en évidence aucune variation importante du pH interne lors du pompage dans les GUVs (voir §III.3.1.1).

Effet du glycérol : influence de la viscosité et de la perméabilité

Les expériences avec le glycérol sont décisives pour déterminer si une source de bruit hors équilibre est présente ou non. Les paramètres dynamiques, comme la viscosité η ou le coefficient de perméation λ_p , ne peuvent jouer un rôle qu'en présence d'une source de bruit hors équilibre. L'ajout de glycérol n'a pas d'effet sur les expériences en lumière rouge, puisqu'on retrouve toujours la même valeur de $\kappa \simeq 10 \pm 1 kT$. En revanche, pour les expériences en lumière jaune, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative du changement de température effective par addition de glycérol (voir Fig. III.2.13).

Le glycérol a pour effet d'augmenter la viscosité η du milieu aqueux. Comme nous l'avons déjà souligné, une modification de la viscosité permet de tester la présence d'effets hors équilibre dans nos expériences. Pour une membrane active le théorème fluctuation-dissipation ne s'applique pas : la viscosité peut donc intervenir dans le spectre de fluctuations (voir Eq. II.1.6, p. 97). Pour une membrane passive au contraire, le théorème fluctuation-dissipation s'applique et la viscosité ne doit jouer aucun rôle dans les fluctuations de forme de la membrane (voir Eq. I.1.5, p. 14). Le fait que l'augmentation de viscosité modifie les expériences de micropipettes en lumière jaune sans modifier celles en lumière rouge montre que la membrane éclairée en jaune est active alors que lorsqu'elle est éclairée en rouge, elle est passive.

Le glycérol peut aussi avoir d'autres effets qu'une simple augmentation de la viscosité du milieu. Il peut par exemple modifier les caractéristiques de la bicouche, notamment sa perméabilité (voir §III.1.5.1). Le coefficient de perméabilité du glycérol pur à travers une bicouche lipidique est de l'ordre de $\Lambda_p \simeq 5 \times 10^{-8} \text{ m/s}$ [Alberts et al., 1994], soit près de trois ordres de grandeur plus faible que celui de l'eau pure $\Lambda_p = 40 \times 10^{-6} \text{ m/s}$ (voir Fig. I.2.7, p. 42). Le coefficient de perméation λ_p est, comme la viscosité, un paramètre dynamique qui intervient dans le temps de relaxation de la membrane (voir Eq. I.1.31 p. 23). Tout comme la viscosité, il disparaît du spectre de fluctuations à cause du théorème fluctuation-dissipation dans le cas d'une membrane passive (voir Eq. I.1.5, p. 14), alors qu'il peut rester présent dans le spectre de fluctuations d'une membrane active (voir Eq. II.1.6, p. 97). Si la valeur de λ_p est modifiée en présence de glycérol, on s'attend à observer un effet uniquement dans le cas où la BR est active, c'est-à-dire en lumière jaune. C'est bien ce que l'on observe expérimentalement.

Enfin, la présence de glycérol pourrait aussi modifier le fonctionnement de la BR, en changeant par exemple le rendement du pompage de protons. Dans ce cas, on s'attend encore à observer un effet de l'addition de glycérol uniquement sur les expériences où la BR est active, ce qui prouverait que l'augmentation de l'excès de surface que l'on observe est bien d'origine hors équilibre.

Nous montrons donc bien ici que des phénomènes hors équilibre gouvernent les fluctuations de la membrane lorsque la BR est éclairée en lumière jaune. Ces phénomènes actifs sont liés au pompage de la BR : changements de conformation de la protéine, passage du proton et éventuellement de molécules d'eau.

III.2.3.3 Comparaison avec les modèles théoriques

La discussion des paragraphes précédents confirme l'interprétation proposée plus haut. Lorsque les vésicules sont éclairées en jaune, la BR est active et pompe les protons. Le pompage exerce une force locale hors équilibre sur la membrane et ajoute une source de bruit actif pour les fluctuations de la membrane. L'amplitude des fluctuations est donc augmentée et on peut 'tirer' un excès de surface plus important que lorsque la BR ne pompe pas, c'est-à-dire en lumière rouge. On observe une diminution de la pente κ/T dans les expériences de micropipettes en lumière jaune, qui indique bien qu'une source de bruit s'ajoute au bruit thermique lorsque la membrane est active. Nous allons maintenant comparer cette interprétation des expériences de micropipettes aux prévisions de la théorie d'une membrane active libre (voir §II.1). Comme nous l'avons annoncé au paragraphe III.1.5, nous ne connaissons pas *a priori* les valeurs de tous les paramètres qui interviennent dans le modèle théorique, notamment le coefficient de perméation λ_p et la force active F_a . Notre démarche consistera donc à estimer le flux $\Phi = \lambda_p F_a$ à partir des résultats expérimentaux.

Accord qualitatif avec la théorie

Qualitativement, la théorie prévoit une amplification des fluctuations de forme d'une membrane active à cause de la présence du bruit hors équilibre qui se superpose au bruit thermique. Dans les expériences de micropipettes, nous observons bien une augmentation de l'excès de surface stocké dans les fluctuations lorsque la BR pompe les protons. Les résultats expérimentaux sont donc en bon accord qualitatif avec les prévisions théoriques pour une membrane active.

Pour une interprétation plus quantitative, plusieurs modèles ont été développés au cours de la partie théorique : membrane libre, membrane en présence de paroi, modèle plus complet où est intégré le couplage entre la courbure et le flux diffusif de protéines. Dans les expériences de micropipettes, les vésicules sédimentent sur la lamelle de verre puis sont aspirées dans la micropipette. L'aspiration décolle la vésicule de la lamelle suffisamment pour justifier que les interactions avec la paroi sont négligeables : la distance entre la vésicule dans la micropipette et la lamelle est alors de l'ordre de quelques microns. La théorie d'une membrane active libre semble donc la plus adaptée aux expériences de micropipettes (voir §II.1). Cependant, nous n'avons tenu compte ni de la géométrie sphérique ni de la présence de la pipette dans l'analyse théorique. La première hypothèse est justifiée puisque l'on a toujours $\sqrt{\kappa/\sigma} \ll R_{ves}$, pour $\sigma_0 < \sigma < \sigma_c$ où $\sigma_c \simeq \chi kT/8\pi\kappa$ est la tension au-delà de laquelle le terme linéaire σ/χ l'emporte sur le terme logarithmique $(kT/8\pi\kappa) \ln \sigma$ dans l'équation III.2.4.

Interprétation en terme de température effective

Nous avons décrit l'effet du pompage sur les expériences de micropipettes en introduisant la notion de température effective. Cette démarche semble très naturelle puisque la variation de

$\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ reste apparemment linéaire dans les expériences en lumière jaune. On observe une simple diminution de pente, donc une augmentation de la température effective de la membrane. Le comportement linéaire de l'équation III.2.4 a été démontré pour une membrane passive à partir du spectre de fluctuations passif donné par l'équation I.1.5 (voir §§I.1.2.2 et III.2.1.1) : c'est une conséquence directe de la présence dans le spectre de fluctuations du terme en $1/q_-^4$ dû au bruit thermique.

Pour une membrane active, si on néglige tout effet lié à l'asymétrie de forme de la BR, on s'attend à l'apparition d'un nouveau terme dans le spectre de fluctuations à cause de la présence du bruit hors équilibre (voir Eq. II.1.6, p. 97). En conséquence, un terme correctif dû à la contribution active au spectre de fluctuations devrait donc apparaître dans l'équation III.2.4, s'ajoutant au terme linéaire dû à la contribution thermique. Si la partie active du spectre de fluctuations ne se comporte pas comme $1/q_-^4$, ce qui est vrai par exemple dans la limite des grandes longueurs d'onde, alors ce terme correctif ne sera pas linéaire en fonction de $\ln \sigma$. Pour un spectre en $1/q_-^n$ où $n > 4$, on s'attend à ce que la variation exponentielle de σ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ démontrée pour un spectre en $1/q_-^4$ (voir Eq. III.2.4) devienne une loi de puissance.

Les ajustements linéaires de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ à faible déformation semblent aussi bons pour les expériences actives que pour les expériences passives. Ces ajustements sont cependant effectués sur un petit nombre de points expérimentaux et une faible gamme de valeurs de $\alpha_0 - \alpha$ accessibles : il est très difficile dans ces conditions de distinguer un comportement purement linéaire d'un comportement comportant une contribution non linéaire. La technique de micropipettes, si elle permet bien de mettre en évidence une différence entre le cas actif et le cas passif, n'est donc pas suffisamment précise pour observer une déviation par rapport au comportement linéaire, ce qui aurait permis de remonter à la loi de puissance du terme actif dans le spectre de fluctuations.

Pourtant, dans le cas simple d'une membrane tendue et dans la limite des grandes longueurs d'onde, que l'on néglige le couplage entre la courbure de la membrane et la diffusion des centres actifs dû à une éventuelle asymétrie (voir §§I.1.1.2, Eq. II.1.10, p. 98) ou qu'on le prenne en compte, (voir §§I.3.3.3, Eq. II.3.11, p. 135, la contribution active au spectre de fluctuations possède la même loi de puissance que la contribution passive :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta^2\rho\lambda_p^2F_a^2}{\sigma^2q_-^2} + \frac{kT}{\sigma q_-^2}.$$

On s'attend, avec ces hypothèses, à ce que le comportement du logarithme de la tension en fonction de la variation d'excès de surface soit linéaire, aussi bien dans le cas actif que dans le cas passif. On introduit la température effective T_{eff} de la membrane active définie par : $T_{eff} = T + T_{act}$, avec $T_{act} = 16\eta^2\rho\lambda_p^2F_a^2/k\sigma$ (voir §§I.1.2). On obtient donc une augmentation relative de température égale à :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_{eff} - T}{T} = \frac{16\eta^2\rho\lambda_p^2F_a^2}{\sigma kT}. \quad (\text{III.2.5})$$

On trouve typiquement $\Delta T/T \simeq 1$ dans les expériences de micropipettes. En prenant $\sigma \simeq$

10^{-6} N/m pour la tension typique d'une expérience de micropipettes dans le régime des faibles tensions, on peut estimer : $\Phi = \lambda_p F_a \simeq 1.6 \times 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$.

Dans cette interprétation, le terme faisant intervenir le module de courbure a été négligé, puisqu'à la limite $q_- \rightarrow 0$, on a $\sigma q_-^2 \gg \kappa q_-^4$. Un calcul plus complet est présenté au paragraphe suivant.

Prise en compte du changement du spectre de fluctuations pour une membrane active

En général, si on néglige l'asymétrie de la protéine, le terme actif du spectre de fluctuations présente une loi de puissance différente du terme thermique (voir §§I.1.6). Il faut donc refaire le calcul de l'excès de surface $\alpha = \Delta A/A = \langle (\nabla_- u)^2 \rangle / 2$ présenté au paragraphe §§I.1.2.2. On a :

$$\langle (\nabla_- u)^2 \rangle = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{q_{min}}^{q_{max}} q_-^2 \langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle 2\pi q_- dq_-, \quad (\text{III.2.6})$$

avec $q_{min} = 2\pi/L$ et $q_{max} = 2\pi/a$ et où $a = 0.5 \text{ nm}$ est une distance microscopique et $L = 10 \mu\text{m}$ est la longueur d'onde maximale des fluctuations, donnée par le rayon de la vésicule utilisée dans l'expérience de micropipettes.

Le calcul de l'excès de surface à l'aide du spectre complet $\langle (\nabla_- u)^2 \rangle$ donné par l'équation II.1.6 (p. 97) fait intervenir des intégrations non triviales. Nous allons donc simplifier l'expression du spectre de fluctuations à l'aide de diverses approximations.

Dans le cas de vésicules, l'approximation $\mathbf{q}_- \rightarrow 0$ n'est pas valable puisque la longueur d'onde des fluctuations est limitée par la taille de la vésicule $L = R_{ves} \simeq 10 \mu\text{m}$. Le bruit de 'shot' n'est alors pas forcément négligeable devant le bruit dû aux fluctuations de densité de BR. On doit donc estimer l'importance relative des deux sources de bruit. La loi d'échelle II.1.21 (p. 108) donne l'ordre de grandeur du terme dû aux fluctuations de densité de BR :

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\rho\lambda_p^2F_a^2}{D\kappa} \frac{L^4}{1 + L/4\lambda_p\eta},$$

ce qui devient, en utilisant $L \gg \lambda_p\eta$:

$$\langle u(L)^2 \rangle = \frac{\eta\rho\lambda_p^2F_a^2}{D\kappa} L^3.$$

Le terme dû au bruit de 'shot' est donné par l'équation II.1.23 (p. 110) :

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho\tau\lambda_p I_0}{(1 + L/\lambda_p\eta)(\sigma + \kappa L^{-2})},$$

ce qui donne, avec $L \gg \lambda_p\eta$ et $\sigma \gg \kappa L^{-2}$:

$$\langle u(L)^2 \rangle \propto \frac{\rho\tau\lambda_p^2 I_0}{\sigma L}.$$

En supposant que $I_0 \simeq F_a^2$, on trouve $\eta\rho\lambda_p^2F_a^2L^3/D\kappa \gg \rho\tau\lambda_p^2 I_0/\sigma L$ donc le terme de bruit de 'shot' est toujours négligeable devant la bruit dû aux fluctuations de densité de BR.

On simplifie l'expression complète du spectre de fluctuations (Eq. II.1.6, p. 97) en ne tenant compte que des fluctuations de densité de BR :

$$\langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2 = \tau_m(\mathbf{q}_-) \left[\frac{\rho \lambda_p^2 F_a^2}{\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} + D q_-^2 / 4} \right] + \frac{kT}{\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2},$$

avec

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

Dans les expériences de micropipettes, on a $6 \times 10^5 < q_- < 10^{10} \text{ m}^{-1}$, puisqu'il s'agit de vésicules de taille de l'ordre de la dizaine de microns. On a donc toujours $\lambda_p \ll 1/4\eta q_-$. Si on suppose de plus $\sigma q_-^2 \ll \kappa q_-^4$, hypothèse que l'on justifiera ci-dessous, le temps de relaxation de la membrane devient :

$$\tau_m(\mathbf{q}_-)^{-1} = \frac{\kappa q_-^3}{4\eta}.$$

Enfin, on a $\kappa q_-^3 / \eta \gg D q_-^2$, puisque, avec les ordres de grandeur précédents, $q_- \gg D\eta/\kappa \simeq 2 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$. On peut donc encore simplifier le spectre de fluctuations qui devient :

$$\langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2 = \frac{16\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\kappa^2 q_-^6} + \frac{kT}{\kappa q_-^4}. \quad (\text{III.2.7})$$

Dans le cas particulier des expériences de micropipettes, la contribution active au spectre de fluctuations se comporte donc en $1/q_-^6$. On s'attend donc à une déviation non linéaire par rapport à la contribution passive en $1/q_-^4$.

L'intégrale de l'équation III.2.6 est divergente à petit q_- . On coupe donc à la borne inférieure $q_- = \sqrt{\sigma/\kappa}$ ce qui justifie *a posteriori* l'hypothèse $\sigma q_-^2 \ll \kappa q_-^4$ faite plus haut. L'intégration doit donc se faire entre $q_{min} = \sqrt{\sigma/\kappa}$ et $q_{max} = 2\pi/a$. La contribution du terme actif à l'excès de surface est donc :

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{q_{min}}^{q_{max}} \frac{q_-^2}{2} \frac{16\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{\kappa^2 q_-^6} 2\pi q_- dq_- \\ &= \frac{16\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{8\pi\kappa} + \text{cte.} \end{aligned} \quad (\text{III.2.8})$$

Le terme passif est inchangé. On en déduit l'expression de la variation de l'excès de surface $\alpha_0 - \alpha$ mesuré dans les expériences de micropipettes aux faibles déformations :

$$\boxed{\alpha_0 - \alpha = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma}{\sigma_0} + \frac{kT}{8\pi\kappa} \sigma_a \left(\frac{1}{\sigma_0} - \frac{1}{\sigma} \right)}, \quad (\text{III.2.9})$$

avec

$$\sigma_a = \frac{16\eta^2 \rho \lambda_p^2 F_a^2}{kT} \quad (\text{III.2.10})$$

On voit d'après l'équation III.2.9 que le terme actif ajoute une correction non linéaire en $1/\sigma$ à l'expression passive de la variation d'excès de surface. Nous avons donc réanalysé les données des expériences de micropipettes à l'aide de cette équation corrigée. On commence par extraire la valeur du module de courbure κ à partir de l'expérience passive en lumière rouge par un ajustement linéaire aux faibles déformations conformément à l'équation III.2.4. Puis on

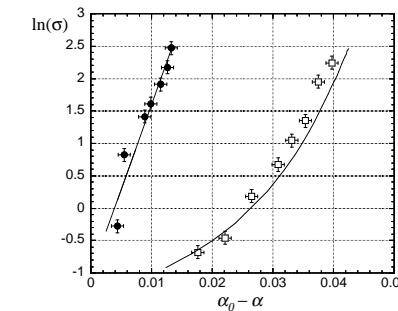


FIG. III.2.14: Exemple d'ajustement de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ effectué à l'aide du spectre de fluctuations actif négligeant le couplage entre la courbure et la diffusion (voir Eq. III.2.9). L'ajustement linéaire de l'expérience effectuée en lumière rouge (cercle pleins) donne la valeur de κ . On utilise cette valeur du module de courbure pour effectuer l'ajustement de l'expérience effectuée en lumière jaune à l'aide de l'équation III.2.9 (cercles vides) et en déduire les paramètres σ_0 et σ_a . On obtient ici $\kappa = 10.4 \text{ kT}$, $\sigma_0 = 0.25 \pm 0.03 \mu\text{N/m}$ et $\sigma_a = 1.85 \pm 0.29 \mu\text{N/m}$.

injecte la valeur de κ dans l'équation corrigée III.2.9 et on ajuste les données de l'expérience active correspondante à l'aide des paramètres ajustables σ_a et σ_0 . La figure III.2.14 illustre cette procédure pour une expérience donnée.

L'ajustement corrigé par le terme non linéaire est aussi bon que l'ajustement linéaire utilisé lors de l'interprétation en terme de température effective. Les valeurs trouvées pour les paramètres σ_a et σ_0 sont regroupées sur le tableau III.2.1. Pour σ_0 , on trouve typiquement $0.2 \mu\text{N/m}$ ce qui correspond bien à l'ordre de grandeur de la tension dans des vésicules peu tendues avant aspiration dans la micropipette. Les valeurs de σ_a sont dispersées autour de $1 \mu\text{N/m}$ (voir Fig. III.2.15). La moyenne sur les données du tableau III.2.1 donne $\sigma_a = 1.0 \pm 0.3 \mu\text{N/m}$. A partir de l'expression théorique de σ_a donnée par l'équation III.2.10, on peut calculer l'ordre de grandeur de $\Phi = \lambda_p F_a$. En prenant pour σ_a la valeur moyenne obtenue dans les expériences $\sigma_a \simeq 10^{-6} \text{ N/m}$, on trouve : $\Phi \simeq 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$.

Influence de la viscosité et de la perméation

Nous avons vu que l'ajout de glycérol provoque une diminution importante de l'effet du pompage de la BR sur les fluctuations de la membrane. Comme nous l'avons souligné plus haut (voir §III.2.3.2), l'addition de glycérol peut avoir plusieurs conséquences, dont les plus importantes pour l'interprétation des expériences de micropipettes sont l'augmentation de la

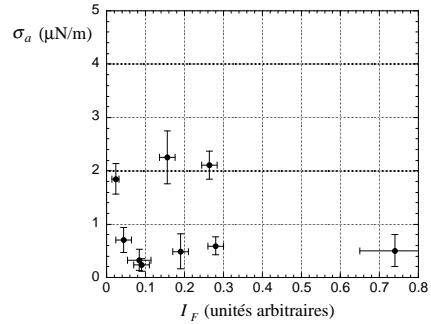


FIG. III.2.15: Valeur du paramètre σ_a caractéristique de l'activité lorsque l'on néglige le couplage entre la courbure et la diffusion (voir Eq. III.2.8) en $\mu\text{N}/\text{m}$ en fonction de l'intensité de fluorescence I_F .

Rayon (μm)	I_F (u. a.)	$\kappa (\times kT)$	$\sigma_0 (\mu\text{N}/\text{m}) \pm \chi^2$	$\sigma_a (\mu\text{N}/\text{m}) \pm \chi^2$
11.2	0.023	10.4	0.25 ± 0.03	1.85 ± 0.29
13.2	0.045	8.0	0.20 ± 0.05	0.70 ± 0.23
9.7	0.083	8.2	0.25 ± 0.07	0.32 ± 0.20
31.7	0.091	9.2	0.16 ± 0.04	0.23 ± 0.12
19.6	0.156	11.0	1.40 ± 0.14	2.25 ± 0.50
18.6	0.190	12.0	0.54 ± 0.15	0.49 ± 0.33
31.6	0.264	9.4	0.72 ± 0.05	2.10 ± 0.27
35.3	0.279	11.0	0.15 ± 0.03	0.59 ± 0.17
33.5	0.739	9.6	0.26 ± 0.09	0.50 ± 0.30

TAB. III.2.1: Valeur des paramètres σ_a et σ_0 qui interviennent dans les ajustements prenant en compte le terme hors équilibre du spectre de fluctuations (voir Eq. III.2.8) dans le modèle négligeant le couplage entre la courbure et la diffusion.

viscosité du milieu η et la diminution du coefficient de perméation de la membrane λ_p . Le glycérol pourrait aussi modifier le fonctionnement de la BR, mais nous ne disposons d'aucun modèle pour tenir compte de cet effet. Le résultat essentiel des expériences de micropipettes en présence de glycérol est l'observation d'un effet de l'ajout de glycerol lorsque la membrane est active, alors qu'aucune modification n'est détectée lorsque la membrane est passive. Nous proposons ci-dessous quelques éléments d'interprétation plus quantitative à l'aide du modèle théorique de membrane active.

D'après le modèle théorique d'une membrane libre, une augmentation de la viscosité devrait entraîner une augmentation de l'amplitude des fluctuations. En effet, le temps de relaxation d'une membrane libre augmente si η augmente (voir Eq. I.1.31, p. 23). Les forces locales hors équilibre exercées par les centres actifs s'appliquent donc sur la membrane pendant un temps plus long et amplifient les fluctuations de forme de la membrane. Pour cette raison, la viscosité η intervient toujours au numérateur des lois vérifiées par une membrane active (voir Eq. II.1.6, p. 97, Eq. II.1.7, p. 97 et Eq. II.1.10, p. 98). Le coefficient de perméation λ_p intervient toujours associé à la force active $F = F_a$ ou $I_0^{1/2}$, puisque $\Phi = \lambda_p F$ mesure le flux de solvant qui traverse la membrane (en m^3/s). Il se trouve donc lui aussi toujours au numérateur.

L'application aux expériences de micropipettes du modèle de membrane active libre, décrit au paragraphe §II.1, montre que c'est le produit $\eta^2 \lambda_p^2$ qui intervient dans la quantification de l'effet du pompage de la BR (voir Eq. II.1.6, p. 97 et Eq. III.2.10). On s'attend donc à ce que, d'un côté, l'addition de glycérol amplifie l'effet du pompage par augmentation de la viscosité, et d'un autre côté, elle le réduise par diminution du coefficient de perméation. L'addition de 25 % de glycérol provoque une réduction d'un tiers de l'effet du pompage. Si on sait que la viscosité est multipliée par 2 par addition de 25 % de glycérol, il est en revanche beaucoup plus difficile d'estimer la diminution de la perméation. On peut toutefois supposer que la variation de perméation par ajout de glycérol est plus rapide que celle de la viscosité, puisque le coefficient de perméabilité varie de trois ordres de grandeur entre 0 et 100 % de glycérol (voir §III.2.3.2). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'effet du pompage sur les fluctuations en présence de glycérol.

Influence de la densité de BR

Dans la théorie d'une membrane active libre, le spectre de fluctuations et donc l'amplitude des fluctuations dépend de la concentration de centres actifs. Lorsque la densité de centres actifs augmente, on s'attend intuitivement à un effet d'amplification des fluctuations plus important. C'est effectivement ce que prévoit la théorie dans sa version la plus simple, puisque la densité de centres actifs ρ intervient toujours au numérateur dans les expressions du paragraphe §II.1 (voir Eq. II.1.6, p. 97, Eq. II.1.7, p. 97 et Eq. II.1.10, p. 98). L'effet de l'activité sur les fluctuations de forme d'une membrane doit, d'après ces expressions, varier linéairement avec ρ .

Dans nos expériences de micropipettes, la densité ρ de BR n'est pas très bien connue (voir

§III.1.4.3). L'intensité relative de fluorescence I_F ne donne pas une valeur absolue de la densité. Cependant, I_F varie de près d'un facteur 10 dans les expériences et on devrait donc observer une forte variation de l'effet de l'activité en fonction de l'intensité de fluorescence si la version simple de la théorie s'appliquait. D'après les résultats expérimentaux, l'effet observé, quantifié à l'aide du changement de température effective (voir Figs. III.2.10 et III.2.11) ou à l'aide du paramètre σ_a (voir Fig. III.2.15), ne dépend pas de l'intensité de fluorescence de manière claire. Dès que la BR est incorporée dans la membrane, une forte augmentation de température effective, de presque un facteur 2, apparaît, puis reste constante malgré l'augmentation de la densité de BR. Plusieurs explications peuvent être apportées.

Le comportement linéaire en fonction de ρ prévu par le modèle théorique suppose que la densité de centres actifs dans la membrane est faible. En régime non dilué, les centres actifs peuvent interagir et la dépendance avec ρ peut être plus compliquée. Dans les expériences, si on suppose que la plus grande partie de la BR est incorporée dans les membranes lipidiques d'EPC, le rapport lipides/protéines est de l'ordre de 100 lipides/BR (voir §§III.1.3 et III.1.4.3). L'approximation de régime dilué n'est alors évidemment pas valable. On observerait donc dans nos expériences un régime saturé où, à cause d'effets collectifs, l'augmentation du nombre de protéines dans la membrane ne provoque aucune augmentation de l'effet sur les fluctuations de la membrane. La dépendance linéaire avec ρ se trouverait à des concentrations en BR beaucoup plus faibles que nous ne pouvons pas atteindre avec la technique d'électroformation des GUVs ou bien que nous ne pouvons pas détecter à cause du faible niveau de fluorescence des vésicules correspondantes. Nous allons voir, dans le paragraphe suivant, que le modèle présenté au paragraphe II.3.3 prenant en compte le couplage entre le flux diffusif de centres actifs et la courbure de la membrane, permet de rendre compte de l'absence de dépendance avec ρ dans certains domaines de longueur d'onde.

Prise en compte du couplage entre la diffusion des protéines et la courbure

Le modèle théorique du paragraphe II.3.3 est un modèle plus complet qui tient compte du couplage entre le flux diffusif de centres actifs dans la membrane et la courbure de celle-ci. Si la forme des centres actifs n'est pas symétrique, les centres actifs préfèrent diffuser vers des régions où la courbure de la membrane est la mieux adaptée à leur asymétrie. Puisque la BR n'est pas complètement symétrique à cause de la présence d'une 'queue' de 38 acides aminés du côté cytoplasmique (voir §III.1.2.1 et §III.1.4), on peut essayer d'appliquer ce modèle pour interpréter les expériences de micropipettes.

Le spectre de fluctuations obtenu en tenant compte du couplage entre la courbure et la diffusion des protéines est donnée par l'équation II.3.12) :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q^4} \frac{\kappa \lambda_p F_a / \Xi D}{(1 + q_-/q_{c1})(1 + q_-/q_{c2})},$$

où Ξ est le coefficient de couplage entre les gradients de courbure de la membrane et le flux

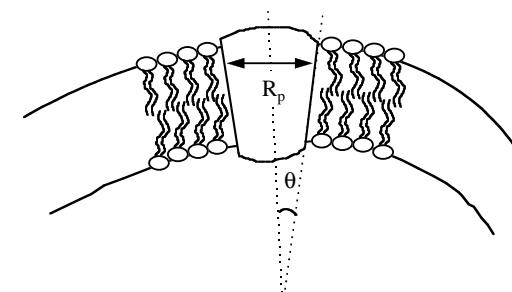


FIG. III.2.16: Notations utilisées pour décrire l'asymétrie des protéines.

de centres actifs, q_{c1} et q_{c2} sont des vecteurs d'onde de coupure définis au paragraphe §II.3.3 : $q_{c1} = 4\eta D/\kappa$ et $q_{c2} = (4\eta\lambda_p F_a \Lambda \Xi)/(D\kappa)$.

Si $q \ll q_{c1}$ et $q \ll q_{c2}$, le spectre de fluctuations se comporte comme $1/q^4$. L'effet de l'activité des centres actifs est alors indépendant de la densité ρ de centres actifs et se traduit par une simple renormalisation de la température :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT_{eff}}{\kappa q^4},$$

où la température effective est définie par $T_{eff}/T = 1 + \kappa\lambda_p F_a / \Xi D$. On en déduit l'augmentation de température effective suivante :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_{eff} - T}{T} = \frac{\kappa\lambda_p F_a}{\Xi D}. \quad (\text{III.2.11})$$

Avec les hypothèses énoncées ci-dessus, ce modèle permet de comprendre pourquoi les ajustements linéaires de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ sont aussi bons en lumière jaune qu'en lumière rouge, puisqu'on s'attend ici à une simple renormalisation de la température. Enfin, l'effet prévu dû à l'activité hors équilibre est indépendant de la densité de BR, ce que nous observons dans nos expériences.

Le coefficient de couplage Ξ dépend du degré d'asymétrie de la protéine. On a vu que $\Xi \simeq 2\kappa R_{BR}\theta$ où R_{BR} est le rayon de la BR et θ est l'angle du cône modélisant l'asymétrie de la protéine (voir §III.2.3.1 et Fig. III.2.16). Avec $R_{BR} = 2$ nm (voir §III.1.2.1) et pour une forte asymétrie de $\theta = 10^{-1}$ rad, on trouve $\Xi \simeq 1.6 \times 10^{-29}$ J.m. Dans nos expériences, on observe un changement de température effective de l'ordre de $\Delta T/T \simeq 1$. On peut, à l'aide de l'équation III.2.11, déduire la valeur de $\Phi = \lambda_p F_a$ sous les hypothèses $q \ll q_{c1}$ et $q \ll q_{c2}$. On trouve $\Phi \simeq 4 \times 10^{-21} \text{ m}^3/\text{s}$. Nous allons voir cependant au paragraphe suivant que, dans le cas de vésicules, les hypothèses $q \ll q_{c1}$ et $q \ll q_{c2}$ ne sont plus valables.

En effet, la situation est plus compliquée car, dans le cas des vésicules, comme nous l'avons vu plus haut, le vecteur d'onde est limité par $2\pi/R_{ves} < q_- < 2\pi/a$, soit : $6 \times 10^5 < q_- < 10^{10} \text{ m}^{-1}$,

avec $R_{ves} \simeq 10 \mu\text{m}$ pour le rayon de la vésicule, et $a = 0.5 \text{ nm}$ pour la distance moléculaire. On peut montrer, à l'aide des ordres de grandeur du paragraphe III.1.5, que $q_- \gg q_{c1} \simeq 10^5 \text{ m}^{-1}$ et donc :

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{4kT\eta\lambda_p F_a}{\kappa\Xi q_-^5(1 + q_-/q_{c2})}, \quad (\text{III.2.12})$$

où $q_{c2} = (4\eta\lambda_p F_a \Lambda\Xi)/(D\kappa)$ avec $\Lambda = \bar{\rho}D/kT$. Dans ce cas, l'effet de l'activité ne se traduit pas par une simple renormalisation de la température. Comme précédemment, on peut, à l'aide de ce spectre de fluctuations, recalculer la variation d'excès de surface $\alpha_0 - \alpha$ en fonction de la tension σ . La correction due au terme actif est de nouveau non linéaire. Pour simplifier le calcul de $\alpha_0 - \alpha$, nous allons distinguer ci-dessous deux cas, selon que $q_- \gg q_{c2}$ ou $q_- \ll q_{c2}$.

Si $q_- \gg q_{c2}$, le spectre III.2.12 est à nouveau en $1/q_-^6$:

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{16\eta^2\lambda_p^2\bar{\rho}F_a^2}{\kappa^2q_-^6}. \quad (\text{III.2.13})$$

La dépendance en Ξ s'élimine et on retrouve exactement le spectre obtenu à l'aide du modèle simplifié (Eq. III.2.7). Comme précédemment, la correction non-linéaire est en $1/\sigma$ et on retrouve $\Phi \simeq 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$.

Si $q_- \ll q_{c2}$, le spectre III.2.12 est indépendant de ρ et se comporte comme $1/q_-^5$:

$$\langle u(\mathbf{q}_-)^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa q_-^4} \left(1 + \frac{\xi_a^{-1}}{q_-} \right), \quad (\text{III.2.14})$$

avec $\xi_a = \Xi/(4\eta\lambda_p F_a)$. Le terme actif domine si $q_- \ll \xi_a^{-1}$. En imposant $\xi_a < 1 \mu\text{m}$, on obtient une borne inférieure pour $\Phi = \lambda_p F_a$. En prenant toujours $\Xi \simeq 1.6 \times 10^{-29} \text{ J.m}$, on obtient $\Phi > 4 \times 10^{-21} \text{ m}^3/\text{s}$. On peut montrer, par un calcul en tout point semblable à celui aboutissant à l'équation III.2.9, que la correction non-linéaire à apporter à $\alpha_0 - \alpha$ à cause du terme actif varie alors comme $1/\sigma^{2/3}$:

$$\boxed{\alpha_0 - \alpha = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma}{\sigma_0} + \frac{kT}{8\pi\kappa} \sigma_a^{2/3} \left(\frac{1}{\sigma_0^{2/3}} - \frac{1}{\sigma^{2/3}} \right)}, \quad (\text{III.2.15})$$

avec

$$\sigma_a \simeq 45 \left(\frac{\kappa}{kT} \right)^{1/2} \frac{\eta^2\rho^{1/2}\lambda_p^2 F_a^2}{\Xi} \quad (\text{III.2.16})$$

Nous avons utilisé l'équation III.2.15 pour ajuster à nouveau les données des expériences de micropipette effectuées en lumière jaune (voir Fig. III.2.17). Là encore, l'ajustement corrigé par le terme non linéaire paraît aussi bon que le simple ajustement linéaire utilisé lors de l'interprétation en terme de température effective. Les valeurs trouvées pour les paramètres σ_a et σ_0 sont données au tableau III.2.2. On retrouve $\sigma_0 \simeq 0.5 \mu\text{N}/\text{m}$. Les valeurs de σ_a sont dispersées autour de la valeur moyenne $\sigma_a = 1.8 \pm 0.5 \mu\text{N}/\text{m}$ (voir Fig. III.2.18). Enfin, on peut calculer l'ordre de grandeur de $\Phi = \lambda_p F_a$ à l'aide de l'expression théorique de σ_a donnée par l'équation III.2.16. En prenant pour σ_a la valeur moyenne obtenue dans les expériences $\sigma_a \simeq 2 \times 10^{-6} \text{ N}/\text{m}$, on trouve : $\Phi \simeq 5 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$.

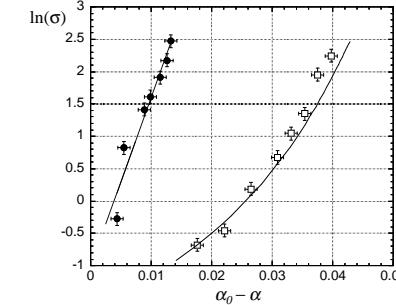


FIG. III.2.17: Exemple d'ajustement de $\ln \sigma$ en fonction de $\alpha_0 - \alpha$ effectué à l'aide du spectre de fluctuations actif prenant en compte le couplage entre la courbure et la diffusion (voir Eq. III.2.15). L'ajustement linéaire de l'expérience effectuée en lumière rouge (cercle pleins) donne la valeur de κ . On utilise cette valeur du module de courbure pour effectuer l'ajustement de l'expérience effectuée en lumière jaune à l'aide de l'équation III.2.15 (cercles vides) et en déduire les paramètres σ_0 et σ_a . On obtient ici $\kappa = 10.4 \text{ kT}$, $\sigma_0 = 0.19 \pm 0.03 \mu\text{N}/\text{m}$ et $\sigma_a = 3.94 \pm 0.73 \mu\text{N}/\text{m}$.

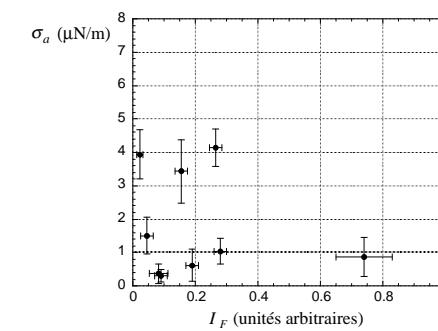


FIG. III.2.18: Valeur du paramètre σ_a caractéristique de l'activité lorsque le couplage entre la courbure et la diffusion est pris en compte (voir Eqs. III.2.15 et III.2.16) en $\mu\text{N}/\text{m}$ en fonction de l'intensité de fluorescence I_F .

Rayon (μm)	I_F (u. a.)	$\kappa (\times kT)$	$\sigma_0 (\mu\text{N}/\text{m}) \pm \chi^2$	$\sigma_a (\mu\text{N}/\text{m}) \pm \chi^2$
11.2	0.023	10.4	0.19 ± 0.03	3.94 ± 0.73
13.2	0.045	8.0	0.20 ± 0.04	1.50 ± 0.55
9.7	0.083	8.2	0.23 ± 0.06	0.37 ± 0.29
31.7	0.091	9.2	0.15 ± 0.04	0.31 ± 0.19
19.6	0.156	11.0	1.37 ± 0.14	3.43 ± 0.95
18.6	0.190	12.0	0.60 ± 0.15	0.62 ± 0.48
31.6	0.264	9.4	0.67 ± 0.04	4.14 ± 0.57
35.3	0.279	11.0	0.13 ± 0.03	1.04 ± 0.39
33.5	0.739	9.6	0.27 ± 0.09	0.87 ± 0.58

TAB. III.2.2: Valeur des paramètres σ_a et σ_0 qui interviennent dans les ajustements prenant en compte le terme hors équilibre du spectre de fluctuations (voir Eq. III.2.15) dans le modèle incluant le couplage entre la courbure et la diffusion.

Pour savoir lequel des deux cas ci-dessus s'applique, une connaissance précise du coefficient de couplage Ξ et du produit $\Phi = \lambda_p F_a$ est indispensable, puisque la valeur de q_{c2} dépend à la fois de l'asymétrie et de l'activité de la BR. L'asymétrie est très difficile à estimer de façon générale et pour la BR en particulier. Si on suppose, comme on l'a fait plus haut, une asymétrie caractérisée par un angle $\theta = 0.1$ rad, on trouve $q_{c2} = 10^6 \text{ m}^{-1}$ et donc $q_- \gg q_{c2}$ pour la plus grande partie du domaine de vecteurs d'onde accessibles dans le cas d'une vésicule $6 \times 10^5 < q_- < 10^{10} \text{ m}^{-1}$. L'asymétrie peut être plus faible, mais puisque q_{c2} dépend linéairement de Ξ , on s'attend à toujours avoir $q_- \gg q_{c2}$ et l'équation III.2.13 s'applique. Si l'asymétrie est plus élevée, le terme en $1/q_-^5$ intervient et on utilise alors l'équation III.2.12, ou même l'équation III.2.14 si q_{c2} est suffisamment grand. Dans tous les cas, les effets prévus par ce modèle tenant compte du couplage entre la courbure de la membrane et la diffusion des centres actifs sont loin d'être négligeables. Comme nous l'avons vu, ce modèle peut aussi rendre compte, dans certains régimes, de la faible dépendance en ρ observée dans les expériences de micropipettes.

III.2.3.4 Discussion des ordres de grandeur obtenus

Nous venons de voir que les résultats expérimentaux sont en bon accord qualitatif avec les prévisions théoriques. Les ajustements non-linéaires des expériences en lumière jaune en supposant un spectre en $1/q_-^5$ ou $1/q_-^6$ sont de qualité comparable aux ajustements linéaires qui supposent un spectre en $1/q_-^4$. Les expériences de micropipette ne permettent donc pas de déduire la loi de puissance du spectre de fluctuations d'une membrane active. En revanche, ces expériences permettent de fournir un ordre de grandeur de l'effet de l'activité et de le comparer aux prévisions théoriques. Les valeurs des paramètres qui interviennent dans le modèle sont difficiles à estimer ce qui rend toute interprétation quantitative des résultats des expériences de micropipettes assez spéculative. Le paramètre qui quantifie l'effet de l'activité des centres

actifs est le produit $\Phi = \lambda_p F_a$. Sur l'exemple des canaux ioniques, nous avons montré que $\Phi \simeq 7 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$ semble être une valeur raisonnable (voir §II.4). Pour la BR, on s'attend, si la force exercée est d'origine hydrodynamique, à une valeur de Φ beaucoup plus petite puisque la BR transporte un proton en 5 ms, alors qu'un canal laisse passer 5000 ions par milliseconde (voir §III.1.5.2). On devrait donc avoir $\Phi \simeq 10^{-23} - 10^{-22} \text{ m}^3/\text{s}$ dans le cas de la BR.

Les résultats des expériences de micropipettes interprétés à l'aide du modèle théorique négligeant l'asymétrie de la protéine donnent typiquement $\Phi \simeq 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$. Si on tient compte du couplage entre la courbure et les flux diffusifs de protéines, on obtient $\Phi \simeq 4 \times 10^{-21} - 5 \times 10^{-20} \text{ m}^3/\text{s}$ en fonction des hypothèses faites sur le régime de vecteur d'onde q_- et en supposant une forte asymétrie de la BR. Les valeurs de Φ déduites des expériences en utilisant les différents modèles dont nous disposons sont donc supérieures à la valeur estimée pour la BR par analogie avec les canaux ioniques. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette observation.

Même si le nombre d'ions transportés par unité de temps est faible comparé à un canal ionique (voir §II.4.2.1), la translocation du proton semble s'accompagner d'importants changements de conformation de la BR (voir §III.1.2.2). La force F_a exercée lors du photocycle pourrait alors être plus importante que celle donnée par le modèle hydrodynamique du paragraphe III.1.5.2.

Le coefficient de perméation au solvant aqueux peut lui aussi être considérablement augmenté pour une membrane contenant de la BR par rapport à une membrane purement lipidique. La BR crée localement des défauts dans l'environnement hydrophobe de la bicoche et pourrait même laisser passer plusieurs molécules d'eau à travers la protéine au cours du photocycle (voir §III.1.2.2). Enfin, lors des expériences de micropipettes, la membrane lipidique est mise sous tension : la tension varie typiquement de $\sigma = 10^{-6} \text{ N/m}$ à $\sigma = 10^{-4} \text{ N/m}$. Il a été récemment montré que lorsqu'une membrane lipidique est mise sous tension, elle devient très perméable à l'eau [Bernard, 1999, Sandre et al., 1999]. Dans ces expériences, la tension de la membrane est induite par l'adhésion électrostatique de vésicules géantes sur un substrat. On observe alors une perméabilité 10^8 fois plus grande que celle d'une bicoche lipidique sans tension [Bernard, 1999] et l'apparition de pores macroscopiques dans la membrane [Sandre et al., 1999]. Même si les tensions appliquées à la membrane dans les expériences de micropipettes sont certainement beaucoup plus faibles que dans ces expériences d'adhésion électrostatique, le coefficient de perméation pourrait être augmenté de façon significative. Nous essayons actuellement de déterminer directement la valeur de λ_p dans les conditions de nos expériences (voir §III.3.1.2).

Chapitre III.3

Améliorations possibles et perspectives

Nous présentons ici quelques idées d'expériences complémentaires. Certaines ont déjà été testées de manière préliminaire et nous en donnerons les premiers résultats. D'autres ne sont qu'au stade de projets ou sont même purement spéculatives.

III.3.1 Vers une meilleure caractérisation du système

Le modèle de membrane active utilisé dans les expériences a permis de mettre en évidence des effets de l'activité sur les fluctuations de forme d'une membrane lipidique. L'interprétation des résultats et la comparaison avec les modèles théoriques sont délicates car le système expérimental, - bacteriorhodopsine reconstituée dans la membrane de vésicules géantes - n'est pas caractérisé au mieux. Beaucoup de questions restent ouvertes et nous proposons ci-dessous quelques idées en vue d'une meilleure caractérisation du système.

III.3.1.1 Densité et orientation de la BR

Contrairement au cas des LUVs (voir §III.1.4.2), la densité et l'orientation des protéines dans les GUVs sont difficiles à déterminer.

Densité de BR

Une indication relative de la concentration de BR est donnée par l'intensité de fluorescence I_F . Cette méthode a permis de montrer que, pour une population de vésicules issue du même dépôt d'électroformation, la quantité de BR incorporée diffère d'une vésicule à l'autre. Il paraît quasiment impossible de mesurer précisément la valeur absolue de la densité de BR présente dans une vésicule donnée par une technique de fluorescence à cause des problèmes liés à la calibration de l'intensité de fluorescence. Une valeur absolue de la densité moyenne peut être déduite du rapport lipides/protéines présent dans le film d'électroformation. Si on suppose que

la BR s'incorpore dans les vésicules avec le même rapport que celui du film initial, on obtient environ 100 lipides/BR, ce qui correspond à une distance entre BR de l'ordre de 10 nm donc à une densité $\rho \simeq 10^{16} \text{ m}^{-2}$ utilisée précédemment. Il pourrait cependant exister une limite à l'incorporation de la BR (voir §III.3.1.3), et la densité de BR dans les vésicules pourrait être plus faible que dans le dépôt.

Une autre méthode pour accéder à la densité moyenne de BR présente dans les vésicules serait de récupérer toutes les vésicules formées à partir d'un dépôt, de redisperser les lipides et la BR par sonication, puis de doser la BR à l'aide du spectre d'absorption (voir §III.1.4.1). En divisant par le nombre de vésicules présentes, en les supposant toutes de la même taille, on peut en déduire la quantité de BR présente en moyenne dans une vésicule. A partir des données de la fin du paragraphe §III.1.4.3, sachant que le volume d'une chambre de formation est de l'ordre de $200 \mu\text{l}$, on devrait obtenir une concentration de BR de l'ordre de $2 \mu\text{g}/\text{ml}$. Cette concentration correspond à une absorbance faible $A_{570} \simeq 5 \times 10^{-3}$ difficilement détectable avec le spectrophotomètre dont on dispose.

Orientation de la BR

L'orientation de la BR n'intervient pas dans la comparaison avec le modèle théorique puisque, pour observer un bruit dû aux fluctuations de concentration, il suffit que F_a soit non nulle, ce qui est le cas pour la BR puisque le pompage de proton est dirigé. En revanche, l'orientation de la BR conditionne l'activité de pompage de la BR puisque le pompage est bloqué par un gradient électrochimique de protons. Dans le cas des GUVs, même si l'orientation était asymétrique, le gradient de pH mettrait un temps plus long à apparaître que dans les LUVs à cause du grand volume interne des vésicules géantes. Mais, d'un autre côté, en l'absence de tampon, les variations de pH ne sont pas amorties, contrairement au cas des LUVs.

Pour déterminer l'orientation de la BR dans les vésicules géantes, nous avons essayé de détecter des changements du pH interne par variation de la fluorescence de la pyranine. Les vésicules géantes ont donc été formées dans un milieu de sucre (50 mM) et de pyranine (40 μM) puis diluées suffisamment pour que la fluorescence externe soit faible devant celle de la pyranine piégée dans les vésicules. L'addition de DPX (voir annexe A) à 1 – 3 mM permet encore de diminuer la fluorescence extérieure par complexation (*quenching*) de la pyranine (voir annexe A). Les vésicules sont ensuite observées sous microscope, éclairées en jaune, avec la puissance maximale de la lampe du microscope (250 mW sur l'échantillon de surface environ 1 cm^2) pour activer la BR, et la fluorescence relative $I_F = \Delta F/F = (F_{\text{ves}} - F_{\text{fond}})/F_{\text{fond}}$ est mesurée à intervalles de temps réguliers par la méthode décrite au §III.1.4.3.

Plusieurs problèmes techniques compliquent ces tests. Tout d'abord, les milieux ne peuvent pas être tamponnés, ce qui rend difficile l'interprétation d'éventuelles variations de pH. On doit de plus tenir compte du photoblanchissement (*photobleaching*) de la pyranine dû à la lumière jaune, puisque la lumière jaune qui active la BR excite aussi la fluorescence de la pyranine.

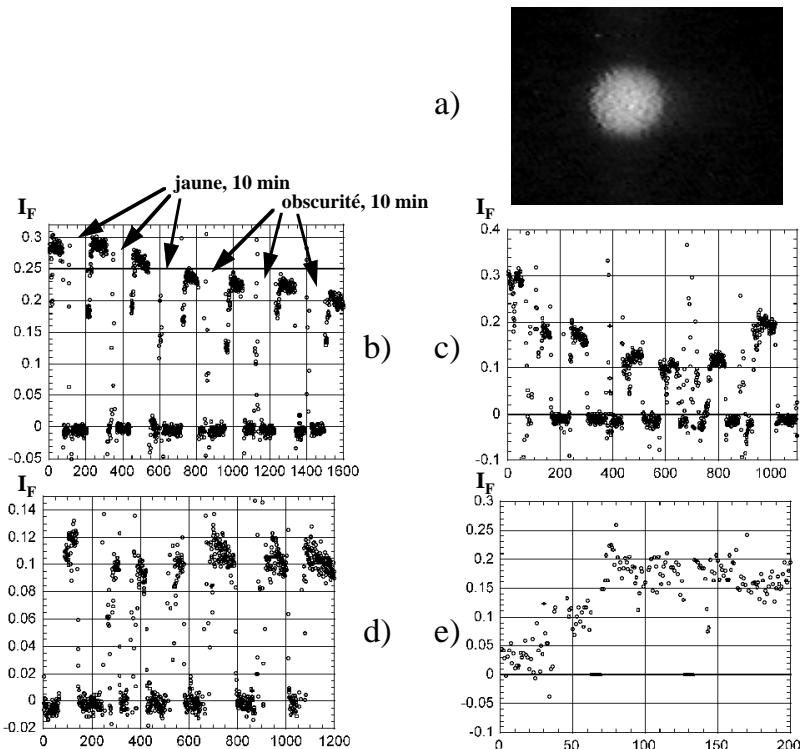


FIG. III.3.1: Variation de l'intensité relative de fluorescence I_F dans les GUVs en fonction du temps. Les vésicules sont éclairées en lumière jaune pendant 3 séquences de 10 min, puis laissées à l'obscurité pendant 3 séquences de 10 min (sauf pour le dernier exemple). La fluorescence est mesurée entre chaque séquence pendant quelques secondes. a) Image en fluorescence d'une vésicule contenant de la pyranine. b) Vésicule purement lipidique. c) à e) Différents comportements obtenus pour des vésicules contenant de la BR.

Pour cela, le contrôle réalisé à l'aide de vésicules purement lipidiques est indispensable et permet d'établir le phénomène de photoblanchiment. Des résultats préliminaires sont présentés à la figure III.3.1. Les vésicules sont éclairées pendant deux ou trois séquences de lumière jaune de 10 minutes, puis laissées à l'obscurité pendant des séquences de 10 min, pour détecter les éventuelles fuites passives de protons. La fluorescence est mesurée à chaque nouvelle séquence. Dans le cas de vésicules purement lipidiques, on observe une diminution de la fluorescence caractéristique du photoblanchiment de la pyranine. Dans le cas de vésicules contenant de la BR, on observe différents types de comportement selon les vésicules. Pour la majorité des vésicules, on retrouve qualitativement le photoblanchiment caractéristique de la pyranine. Mais dans certains cas, la diminution de fluorescence est plus rapide que le simple photoblanchiment, suggérant une diminution de pH due au pompage de protons vers l'intérieur de la vésicule. On observe aussi parfois une augmentation de la fluorescence, ce qui indiquerait une sortie de protons.

L'interprétation de ces tests est délicate et nous ne les avons pas répétés suffisamment pour avoir une statistique vraiment représentative. Même si ces tests ne sont pas complètement concluants, ils semblent indiquer une faible différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules. Les expériences de micropipettes ont montré que l'effet du pompage n'est pas modifié par ajout de KCl, indiquant l'absence de gradient électrochimique de protons. Tout cela semble suggérer que la BR est presque orientée à 50 % dans un sens et 50 % dans l'autre dans les vésicules géantes.

On pourrait aussi essayer de déterminer l'orientation de la BR dans les GUVs en bloquant sélectivement une des deux directions de pompage. Les ions La^{3+} et Gd^{3+} inhibent le pompage lorsqu'ils se trouvent du côté C-terminal de la BR. Dans le cas des LUVs, l'étude comparative des variations de pH en présence ou non de ces ions a permis de montrer l'existence de deux populations de vésicules pompant les protons dans des directions opposées (voir §III.1.4.2) [Seigneuret and Rigaud, 1985]. Dans le cas des GUVs, ces expériences seraient cependant beaucoup plus délicates, notamment à cause des fortes concentrations d'ions La^{3+} ou Gd^{3+} nécessaires pour bloquer la BR.

Des techniques d'attaque protéolytique pourraient donner des indications sur l'orientation de la BR. Pour le moment, la seule façon simple de tester l'orientation de la BR reste l'utilisation de sondes sensibles au pH. Pour éviter les problèmes de photoblanchiment en lumière jaune et pouvoir faire des tests sur des temps longs, on peut envisager l'utilisation d'autres sondes fluorescentes que la pyranine dont la longueur d'onde d'excitation serait plus éloignée du maximum d'absorption de la BR, comme par exemple la 9-amino acridine utilisée dans le cas des LUVs.

III.3.1.2 Force exercée par le pompage et coefficient de perméation

Dans tous les calculs d'ordre de grandeur présentés précédemment, la force active F_a exercée par le pompage et le coefficient de perméation λ_p interviennent. Même si l'effet de l'activité est caractérisé par le produit $\Phi = \lambda_p F_a$, il peut être intéressant de confirmer les ordres de grandeur

obtenus en estimant séparément λ_p et F_a . Nous avons vu au paragraphe III.1.5 que ces deux paramètres sont particulièrement difficiles à évaluer.

J. Pécreaux effectue actuellement au laboratoire des expériences pour mesurer le coefficient de perméation λ_p de vésicules géantes dans les conditions des expériences de micropipettes. Des résultats préliminaires obtenus sur des vésicules purement lipidiques montrent qu'en appliquant une différence de pression de $\Delta P = 0.1$ Pa par l'intermédiaire d'une micropipette, ce qui correspond par la loi de Laplace à une tension de l'ordre de 10^{-6} N/m pour une vésicule de rayon $R_{ves} = 20\ \mu\text{m}$, on observe une diminution de volume de l'ordre de $\Delta V/V = 6\%$ en $t = 30$ min. En supposant grossièrement que la fuite d'eau s'effectue uniformément sur la surface S de la vésicule, le flux $\Phi = \Delta V/t$ est relié à la différence de pression ΔP par $\Phi = \lambda_p \Delta P S$. Avec les valeurs ci-dessus, on déduit : $\lambda_p \simeq 2 \times 10^{-9}\ \text{m}^3/\text{N.s}$. Cette valeur, beaucoup plus grande que celle trouvée par les expériences de choc osmotique (voir §II.4), doit toutefois être confirmée par de nouvelles expériences. Avec $F_a \simeq 10^{-12}$ N, on trouve $\Phi \simeq 2 \times 10^{-21}\ \text{m}^3/\text{s}$, ce qui correspond à l'ordre de grandeur de Φ déduit des expériences de micropipette.

Nous avons montré de façon convaincante que les effets observés dans les expériences de micropipettes sont dûs au pompage de la BR. Pour compléter cette étude, on pourrait utiliser des mutants de la BR qui ne pompent pas de protons ou dont certaines étapes du photocycle sont affectées. Cela permettrait d'effectuer des contrôles supplémentaires, et d'estimer les contributions relatives à la force active F_a dues au passage des protons ou aux changements de conformation de la BR.

III.3.1.3 Existence d'agrégats de BR dans les vésicules ?

Une hypothèse que nous n'avons pas encore vérifiée concerne l'existence d'agrégats de BR dans la membrane des vésicules géantes. Si la bactériorhodopsine ne diffuse pas individuellement mais sous forme d'agrégats, la densité ρ et la force F_a sont renormalisés et le coefficient de diffusion D est modifié. Dans le cadre du modèle simple ne tenant pas compte de l'asymétrie des centres actifs, seul le produit ρF_a^2 intervient (voir par exemple Eqs. III.2.5 et III.2.8). Si les agrégats contiennent n molécules de BR, la force est multipliée par n et la densité est divisée par n . L'effet global de l'activité est donc multiplié par n . Enfin, si la loi de diffusion n'est pas simple, par exemple en présence de désordre gelé, les prévisions théoriques de la partie §II sont modifiées.

Les études de l'incorporation de la BR dans les LUVs ont montré que lorsque le rapport lipides/protéines augmente et devient de l'ordre de 30 lipides/BR, des oligomères (trimères) de BR se forment (voir §III.1.4.2) [Gulik-Krzywicki, 1987]. Il existe donc une limite à l'incorporation de la BR sous forme de molécules isolées dans le cas des LUVs, et on peut penser qu'il en va de même pour les vésicules géantes.

Du point de vue expérimental, les techniques de fluorescence peuvent nous renseigner sur l'existence d'agrégats de BR dans les vésicules. D'après les images de fluorescence classique que

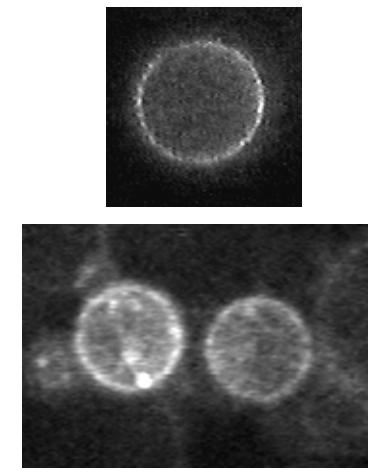


FIG. III.3.2: Images de fluorescence de vésicule contenant de la BR marquée au FITC. La barre représente $20\ \mu\text{m}$.

nous obtenons avec la BR marquée au FITC, il est difficile de conclure de façon certaine quant à la présence d'agrégats, à cause notamment d'inhomogénéités du champ éclairé par le laser. On observe toutefois des zones de membrane qui paraissent plus fluorescentes que le reste de la vésicule et qu'on ne peut pas attribuer à de simples inhomogénéités du champ (voir Fig. III.3.2), mais qui signent peut-être la présence de gros agrégats. Des techniques de transfert de fluorescence ou l'utilisation de marqueurs fluorescents qui s'inhibent par *quenching* lorsqu'ils sont agrégés pourraient préciser ce point.

L'imagerie en fluorescence 2-photons donne des renseignements très précis sur la distribution de fluorescence dans un petit volume d'excitation. Le FITC qui marque la BR peut être utilisé pour visualiser la distribution de BR dans la membrane. Nous essayons actuellement d'obtenir des images 2-photons, en collaboration avec F. Waharte et F. Amblard (Institut Curie, Paris).

Enfin, la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), plus classiquement utilisée, permet, par la mesure du coefficient de diffusion, de faire la distinction entre des molécules isolées et des agrégats diffusant dans la membrane. Une collaboration avec S. Cribier (IBPC, Paris) va être développée pour mesurer le coefficient de diffusion de la BR dans les vésicules géantes.

III.3.2 Technique de micropipettes

Dans les expériences de micropipettes, nous n'avons pu mettre en évidence aucune dépendance de l'effet du pompage en fonction de la densité de BR. La technique de fluorescence utilisée pour détecter la présence de la BR ne nous permet pas de sélectionner les vésicules contenant très peu de BR : on ne peut donc vraisemblablement pas atteindre le régime dilué prévu par la théorie, où l'effet du pompage devrait varier linéairement avec la densité de BR. On pourrait donc essayer de travailler à des rapports lipides/protéines dans le film initial plus faibles. Une autre façon de moduler l'effet du pompage consiste à varier l'intensité de l'éclairage jaune. Nous avons toujours éclairé la BR avec l'intensité maximale. On sait, grâce aux expériences sur les LUVs, que dans ces conditions d'éclairage, la BR est active et que toutes les BR pompent à saturation. On peut effectuer le même type d'expériences de micropipettes que celles décrites au paragraphe III.2 mais dans des conditions d'éclairage moins fort et essayer ainsi de détecter une diminution de l'effet du pompage. On peut aussi aspirer une vésicule à faible pression et voir si la longueur de la membrane aspirée varie en fonction de l'intensité de l'éclairage. Cette dernière idée est testée en ce moment au laboratoire par J. Pécreaux.

Enfin, l'analyse des expériences de micropipettes pourrait être améliorée en tenant compte de la géométrie sphérique dans le modèle théorique. On pourrait aussi évaluer comment la présence de la micropipette modifie les fluctuations d'une membrane active.

III.3.3 Techniques d'analyse spectrale

III.3.3.1 RICM

La technique de RICM permet d'étudier les interactions d'une membrane fluctuant près d'une paroi et donc de tester les prévisions théoriques relatives à la pression répulsive hors équilibre. Son principe est décrit à l'annexe D. Le montage pour réaliser des expériences de contraste interférentiel par réflexion (RICM) a été mis en place et testé de manière préliminaire (voir annexe D). Les conditions optimales pour l'obtention de résultats avec le modèle de membrane active actuel - BR reconstituée dans la membrane de vésicules géantes - n'ont pour l'instant pas été réunies. Lorsque les problèmes techniques seront réglés, ces expériences devraient permettre de comparer le spectre de fluctuations d'une membrane active ou passive près d'une paroi et de mesurer la distance de séparation entre la vésicule et la lamelle lorsque la BR pompe ou non.

La comparaison des expériences de RICM avec le modèle théorique est rendue difficile à cause de la géométrie sphérique. Pour les expériences de RICM, le fait que l'interaction avec la paroi soit localisée sur une partie de la vésicule complique encore le problème. D'après le modèle théorique, seule la partie de la membrane se trouvant à proximité de la paroi va en subir les effets. On peut alors se demander comment l'important excès de surface généré près de la paroi va se redistribuer sur toute la vésicule et quelles en seront les conséquences sur la tension de la

membrane.

III.3.3.2 Analyse de contour

Les techniques d'obtention du spectre de fluctuations par analyse des fluctuations du contour des vésicules sont nombreuses (voir §I.3.1.5). Tout comme le RICM, ces techniques permettraient de mettre en évidence un éventuel changement de loi de puissance du spectre de fluctuations lors du pompage de protons.

La technique d'analyse de contour de vésicules elliptiques, développée par H.-G. Döbereiner (Max-Planck-Institut, Teltow, Allemagne), semble particulièrement bien adaptée à notre problème. Elle repose sur le modèle ADE (voir §I.1.3.3) et permet notamment de détecter des changements de courbure spontanée c_0 [Döbereiner et al., 1997a]. Grâce à l'analyse des fluctuations de contour de la vésicule, on a accès aux variations de l'amplitude des différents modes de fluctuations notés a_n au cours du temps. On peut en déduire les fonctions de distribution de ces différents modes, puis l'amplitude moyenne de chaque mode. Le spectre de fluctuations est obtenu en traçant $\langle a_n^2 \rangle$ en fonction de n . Des résultats préliminaires, en collaboration avec H.-G. Döbereiner, ont montré des effets du pompage de la BR (voir Fig. III.3.3). Ces résultats sont pour l'instant difficilement interprétables et semblent dépendre des vésicules. La statistique (deux vésicules) est encore trop peu représentative et on doit accumuler plus de données pour pouvoir dégager une tendance claire. Ces expériences pourraient mettre en évidence un changement actif de courbure spontanée lorsque la BR pompe les protons.

On peut aussi appliquer la technique plus classique d'analyse de contour de vésicules quasi-sphériques (voir §I.3.1.5). Cette méthode a permis de détecter des faibles variations du module de courbure dues à l'incorporation de peptides ou protéines passives dans la bicoche lipidique [Méléard et al., 1998, Gerbeaud, 1998]. Elle suppose toutefois un comportement du spectre de fluctuations en $1/q_-^4$, ce qui n'est pas forcément le cas pour une membrane active.

III.3.4 Autres systèmes et exemples de membranes actives

III.3.4.1 Systèmes expérimentaux

La BR peut aussi être reconstituée dans des bicouches planes (BLM). Même si la tension de la membrane est plus élevée dans cette géométrie que dans la géométrie sphérique des vésicules, les fluctuations de position de la membrane sont observables. Des techniques de diffusion et de corrélation peuvent alors être employées pour étudier les fluctuations près d'une paroi (spectre de fluctuations, fonctions de corrélation etc...). La réflexion ou la diffusion d'un laser éclairant la membrane permet d'obtenir des informations sur la dynamique des fluctuations (voir §I.1.3.1) [Hirn et al., 1999]. La diffusion de neutrons sur des bicouches fluctuant près d'une surface est aussi un outil puissant pour étudier la force répulsive exercée par une paroi [Charitat et al., 1999].

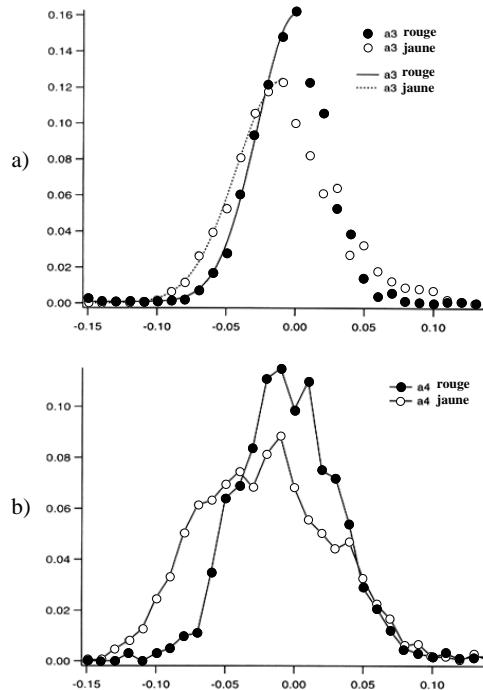


FIG. III.3.3: Résultats préliminaires obtenus par H.-G. Döbereiner par analyse des fluctuations d'une vésicule elliptique éclairée en rouge (cercles pleins) et en jaune (cercles vides). a) Histogramme du mode a_3 et ajustements par une courbe gaussienne. b) Histogramme du mode a_4 . La distribution est plus large lorsque la vésicule est éclairée en jaune. La vésicule étudiée présente de fortes fluctuations entre les formes prolate et oblate, ce qui complique l'interprétation de ce résultat.

D'autres composants actifs peuvent être incorporés dans la membrane. Par exemple, des canaux voltage-dépendants comme l'alaméthicine sont facilement reconstitués dans des bicouches suspendues [Vodyanoy et al., 1993, Bezrukov et al., 1994]. L'ouverture des canaux peut être contrôlée par la différence de potentiel entre les deux côtés de la membrane. Un projet de collaboration avec A. Parsegian (NIH, Bethesda, Etats-Unis) est en cours pour mettre au point un modèle expérimental de membrane active à base de canaux voltage-dépendants. On peut là encore penser à incorporer ces canaux dans des vésicules géantes, ou bien dans des BLMs en géométrie plane.

III.3.4.2 Simulations numériques

Enfin, on peut envisager de simuler numériquement les fluctuations d'une membrane active. Des vésicules elliptiques fluctuant sous l'effet de bruit thermique ont récemment été simulées par G. Gompper et H.-G. Döbereiner (Postdam, Allemagne) à l'aide d'algorithmes de Monte-Carlo. Les observations expérimentales faites sur les fluctuations du contour de vésicules elliptiques sont bien reproduites par les simulations. L'étape suivante consiste à ajouter une source de bruit non thermique et se révèlera être un test très intéressant à la fois de nos prévisions théoriques et de nos résultats expérimentaux.

Quatrième partie

Conclusions

Ce que l'on a fait...

Les membranes biologiques sont des objets très complexes : lorsque l'on cherche à les étudier d'un point de vue de physicien, on est forcément limité à des modèles très simplifiés. Ces modèles ont été utilisés de façon extensive pour décrire les propriétés d'équilibre des membranes. Pourtant, une description physique complète des membranes biologiques doit tenir compte des phénomènes hors équilibre caractéristiques des membranes biologiques. Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'influence de phénomènes hors équilibre sur les fluctuations de forme de membranes lipidiques. Le rôle des fluctuations peut paraître secondaire dans un cadre biologique. Il n'est pas évident que les concepts développés ici jouent un rôle important en biologie. L'exemple du globule rouge nous a montré que les résultats expérimentaux mériteraient d'être réanalysés à l'aide de la théorie des membranes actives. Le globule rouge reste cependant un exemple très particulier de cellule biologique : il se déplace librement dans la circulation sanguine et sa membrane présente des fluctuations de forme prononcées, qui se traduisent optiquement par un phénomène de scintillement. Néanmoins, une cellule interagit le plus souvent avec d'autres cellules ou avec un substrat, ce qui rend particulièrement intéressante l'étude de membranes actives près d'une paroi.

La problématique est donc essentiellement une problématique physique. Le choix d'étudier les fluctuations a été motivé par son importance théorique et par le grand nombre d'outils tant théoriques qu'expérimentaux à notre disposition pour le traiter. Nous avons voulu montrer que la physique des fluctuations d'une membrane hors équilibre est complètement différente de celle d'une membrane à l'équilibre thermodynamique. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des modèles théoriques et expérimentaux simples et originaux à la fois. A partir d'une question inspirée directement de la biologie, nous avons construit un problème de physique statistique qui renouvelle la question des fluctuations de membrane.

Le modèle théorique de membranes dites 'actives' introduit par J. Prost et R. Bruinsma [Prost and Bruinsma, 1996] a été repris et l'utilisation d'arguments en loi d'échelle a permis de l'étendre au cas de membranes actives fluctuant près d'une paroi. Nous avons pu mettre en évidence que l'activité hors équilibre de la membrane introduit une nouvelle source de bruit et amplifie l'amplitude des fluctuations. En présence d'une paroi, une nouvelle force répulsive hors équilibre apparaît : sa portée peut devenir très grande, même pour une membrane tendue. On prévoit donc un changement qualitatif de la nature de la force en présence d'activité hors équilibre par rapport à la force classique de Helfrich à l'équilibre. Sur le plan quantitatif, des calculs d'ordre de grandeur montrent que ces effets devraient être observables expérimentalement.

Nous avons donc choisi un modèle expérimental simple pour tester ces prévisions théoriques. La bactériorhodopsine peut être facilement incorporée dans les membranes de vésicules géantes fluantes tout en préservant son activité de pompe à protons. Disposant de ce système expérimental au laboratoire grâce à D. Lévy et J.-L. Rigaud, nous avons logiquement essayé d'observer l'effet du pompage de la BR sur les fluctuations de forme des vésicules. Pourtant, comparée à un canal ionique pouvant faire circuler un millier d'ions par milliseconde, la BR ne semblait pas

être *a priori* le candidat idéal, avec seulement un proton pompé en 5 ms. Les expériences de micropipettes ont mis en évidence une forte augmentation de l'excès de surface dû aux fluctuations lors du pompage de la BR. On a donc montré de façon claire et pour la première fois à notre connaissance que l'activité biologique hors équilibre a un effet important sur les fluctuations d'une membrane lipidique.

Les expériences de micropipettes illustrent le cas d'une membrane active libre. Les résultats sont en bon accord qualitatif avec la théorie et l'origine hors équilibre des effets observés a été démontrée de façon claire. La comparaison quantitative nécessite une connaissance précise des paramètres du modèle théorique, en particulier en ce qui concerne la force exercée par un centre actif, la perméation en présence d'activité hors équilibre et la dépendance avec la densité de centres actifs. Nous avons montré que l'interprétation des observations expérimentales à l'aide du modèle donne des ordres de grandeur raisonnables pour ces différents paramètres.

Ce qu'il reste à faire...

Sur le plan théorique, inclure la géométrie sphérique dans le modèle paraît un pas important pour une meilleure interprétation des expériences sur les vésicules géantes, surtout en présence d'une paroi. L'essentiel des résultats devrait toutefois rester qualitativement inchangé. Le modèle des membranes actives peut aussi être raffiné de plusieurs façons. Les hypothèses faites sur la force active pourraient être moins contraignantes. La diffusion des centres actifs pourrait suivre des lois plus complexes que la simple diffusion, et l'effet du désordre gelé sur les fluctuations d'une membrane active pourrait aussi être un aspect intéressant. Des calculs ont été commencé dans cette direction. Enfin, des simulations numériques seraient les bienvenues pour tenir compte des termes non-linéaires et permettre de tester les arguments d'échelles que nous avons développés.

Sur le plan expérimental, ce travail ouvre de nombreuses perspectives. Nous avons vu qu'une meilleure caractérisation de la BR reconstituée dans les vésicules géantes serait intéressante en vue d'expériences futures sur ce même système. Les expériences de RICM ont pour but de tester les prévisions théoriques concernant une membrane active près d'une paroi. La première étape consiste à mettre au point les conditions expérimentales optimales pour réaliser ces expériences. La théorie prévoit une forte amplification de la répulsion exercée par la paroi. Cet effet devrait avoir une signature macroscopique, comme par exemple une poussée verticale sur la vésicule. L'effet de la paroi devrait aussi se faire sentir sur les fluctuations de la membrane puisque la théorie prévoit l'existence de toute une variété de régimes de fluctuations différents en fonction de la distance séparant la membrane de la paroi, et en fonction des mécanismes de relaxation de la membrane et de la force active. Les deux techniques expérimentales développées au cours de ce travail, les micropipettes et le RICM, font chacune partie des deux grandes familles de techniques développées pour l'étude des fluctuations de forme des vésicules géantes : les techniques de déformation mécanique et les techniques d'analyse d'image. Elles ne donnent pas le même genre de renseignements, puisque la première intègre tous les modes de fluctuations d'une membrane

libre, alors que la seconde analyse séparément les modes d'une membrane fluctuant près d'une paroi. Il faut donc prendre des précautions quand on interprète les résultats obtenus à l'aide de l'une ou l'autre de ces méthodes et, sur ce point, l'exemple du globule rouge est particulièrement significatif. Des expériences combinant les techniques de micropipettes et de RICM pourraient se révéler très puissantes pour contrôler à la fois la distance à la paroi et la tension de la membrane. On peut aussi imaginer tenir par des micropipettes deux vésicules ou une vésicule et une paroi, et étudier leurs interactions lorsque la BR est active.

Imaginer de nouveaux modèles expérimentaux de membranes actives constitue l'étape suivante. Des systèmes à base de canaux ioniques reconstitués dans une membrane lipidique devraient aussi produire des effets importants. Les récents progrès en biochimie des moteurs moléculaires pourraient aussi permettre d'utiliser les interactions entre têtes de myosine, greffées par exemple sur les lipides, et les filaments d'actine, présents dans le milieu aqueux, pour générer la force active.

Annexe A

Milieux utilisés

Milieux de sucre et glucose pour vésicules géantes

Les vésicules sont préparées dans une solution de sucre (α -D-Glucopyranosyl β -D-fructofuranoside, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $M=342.3$ g/mol, $d = 1.002$, $n = 1.334$, S 8501 Sigma) à 50 mM puis transférées dans une solution de glucose (D-(+)-glucose, $C_6H_{12}O_6$, $M=180.2$ g/mol, $d=1.006$, $n = 1.336$, G 8270 Sigma) de même osmolarité 50 mM. On dépose d'abord une goutte de $30\ \mu\text{l}$ de solution de sucre dans la chambre de manipulation, puis on ajoute $5 - 10\ \mu\text{l}$ de solution de vésicule dans le sucre, selon la quantité de vésicules formées par électroformation. Les vésicules sont prélevées très lentement à partir de la chambre de fabrication à l'aide d'un capillaire en verre de 1 mm de diamètre monté au bout d'un 'pipetman'. Ceci permet de diminuer les cisaillements par flux hydrodynamique et de préserver les plus grosses vésicules ($50 - 100\ \mu\text{m}$ de diamètre).

Après transfert, l'intérieur des vésicules contient donc du sucre et l'extérieur du glucose. Le sucre étant plus dense que le glucose, les vésicules sédimentent au fond de la préparation, près de la lamelle, ce qui facilite leur recherche lors des expériences. La différence d'indice entre le sucre et le glucose augmente le contraste du contour des vésicules sur les images de contraste de phase (technique sensible aux différences d'indices). Pour empêcher le développement de bactéries dans ces milieux riches en sucre, on ajoute un bactéricide, l'azide (sodium azide, NaN_3 , $M = 65$ g/mol, S 2002 Sigma) à une concentration de 1 mM. Les bouteilles de milieux sont conservées à 4°C.

Solution de sucre : 100 ml de sucre à 50 mM et NaN_3 à 1 mM

- Peser 1.7115 g de sucre ou 0.9010 g de glucose dans coupelle plastique.
- Dans un becher de 75 ml, dissoudre le sucre en agitant dans environ 75 ml d'eau distillée.
- Transvaser dans une fiole jaugée et compléter à 100 ml.
- Transvaser dans bouteille de 100 ml.
- Ajouter $100\ \mu\text{l}$ d'azide à 1 M.

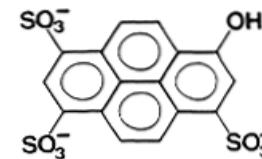


FIG. A.1: Formule chimique de la pyranine.

Solution d'azide : 5 ml d'azide à 1 M

- Peser 325 mg d'azide.
- Dissoudre dans 5 ml d'eau distillée.
- Transvaser dans un petit tube de 5 ml.

Traitement des micropipettes à la BSA

Pour éviter l'adhésion des lipides sur le verre des pipettes, on trempe l'extrémité de la micropipette dans une solution de glucose, identique à celle dans laquelle les vésicules seront transférées, contenant 1 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*, A 3803 Sigma) en masse. La solution monte lentement par capillarité dans la pipette et la BSA s'adsorbe sur le verre. La cinétique d'adsorption est assez rapide et au bout de 20 – 30 min, la micropipette peut être utilisée pour une expérience.

- Peser 0.1 g de BSA en poudre.
- Verser la BSA dans 10 ml de solution de glucose (glucose 50 mM, azide 1 mM).
- Ne pas agiter, laisser reposer et attendre la dissolution complète.
- Aliquoter 20×0.5 ml et ranger au congélateur.

A.1 Milieux fluorescents (pyranine)

Pour essayer de mettre en évidence le pompage de la BR reconstituée dans les GUVs, nous avons utilisé une sonde fluorescence sensible au pH, la pyranine (HPTS—8-hydroxypyrene-1,3,6 trisulfonic acid, trisodium salt, $M = 524$ g/mol, H-348 Molecular Probes, voir Fig. A.1). Le spectre de fluorescence de la pyranine ($\lambda_{exc} = 454$ nm, $\lambda_{em} = 512$ nm) est donné sur la figure A.2. Les vésicules sont formées dans un milieu de sucre (sucre 50 mM, azide 1 mM) contenant $20\ \mu\text{M}$ de pyranine. Pour l'observation sous microscope, elles sont transférées dans un milieu de glucose (glucose 50 mM, azide 1 mM) contenant 2 mM de DPX (p-xylène-bis-pyridinium bromide, $C_{18}H_{18}Br_2N_2$, $M = 422$ g/mol, X-1525 Molecular Probes, voir Fig. A.3) qui permet d'inhiber la fluorescence de la pyranine à l'extérieur des vésicules (*quenching*) : la dilution lors du transfert et

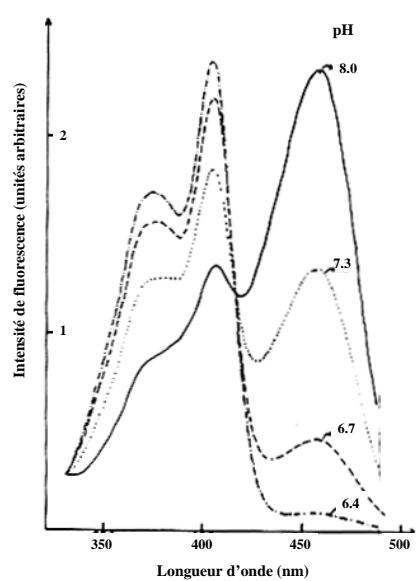


FIG. A.2: Modifications du spectre de fluorescence de la pyranine en fonction du pH.

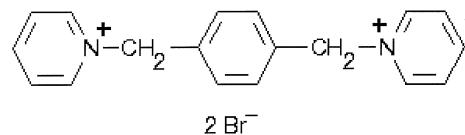


FIG. A.3: Formule chimique du DPX.

l'addition de DPX permettent d'obtenir des images bien contrastées en fluorescence où l'intérieur de la vésicule apparaît clair sur un fond sombre.

Pour finir, on mentionne les deux ionophores cités dans le texte : le FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, $C_{10}H_5F_3N_4O$, $M = 254.2$ g/mol, C 2920 Sigma), ionophore protonique, et la valinomycine (cyclo(-L-Val-D- α -hydroxyisovalericacid-D-Val-L-lacticacid-)₃, $M = 1111.3$ g/mol, V 0627 Sigma) ionophore potassique.

A.2 Milieux contenant des ions K⁺

Pour tester l'effet de la force ionique sur les expériences de micropipettes, nous avons ajouté 2 mM -resp. 4 mM- d'ions K⁺, sous forme de KCl ($M = 74.56 \text{ g/mol}$, P 9333 Sigma) -resp. sous forme de K₂SO₄ ($M = 174.27 \text{ g/mol}$, P 9458 Sigma)-, dans les milieux interne (sucrose 50 mM, azide 1 mM) et externe (glucose 50 mM, azide 1 mM).

- Faire des solutions stock de KCl et de K₂SO₄ à 1 M par dissolution de 7.456 g de KCl et de 17.427 g K₂SO₄ dans 100 ml d'eau distillée.
 - Ajouter 200 µl de KCl ou de K₂SO₄ à 1 M dans les 100 ml de milieu de sucre (sucrose ou glucose 50 mM, azide 1 mM).

A.3 Milieux contenant du glycérol

L'addition de glycérol ($C_3H_8O_3$, $M = 92.1$ g/mol, G 6279 Sigma) dans le milieu modifie sa viscosité η et sa perméabilité à travers la bicoche lipidique Λ_p , donc son coefficient de perméation λ_p . Cela nous a permis d'étudier l'effet des paramètres dynamiques η et λ_p sur les expériences de micropipettes. Nous avons ajouté 16 et 25 % en masse de glycérol dans les milieux de formation (sucrose 50 mM, azide 1 mM) et de transfert (glucose 50 mM, azide 1 mM) des vésicules.

- Prélever 2.7 ml (resp. 4 ml) de glycérol pur.
 - Les ajouter à 18 ml (resp. 15 ml) de solution de sucre (sucrose ou glucose 50 mM, éventuellement KCl ou K_2SO_4 2 mM, et azide 1 mM).
 - Bien agiter.

La figure A.4 représente les variations de la viscosité d'un mélange eau-glycérol en fonction de la concentration en glycérol à 25°C. Nous avons mesuré la viscosité à température ambiante à l'aide d'un viscosimètre capillaire (501 201 II, Schott Geräte), et à la température où sont effectuées les expériences (15 – 16°C) à l'aide d'un rhéoviscoimètre (*digital rheometer*, DV III, Brookfield). Dans nos expériences, les solutions à 16% de glycérol ont une viscosité de $\eta = 1.5\eta_{eau}$ et celles à 25% de glycérol ont une viscosité de $\eta = 2\eta_{eau}$.

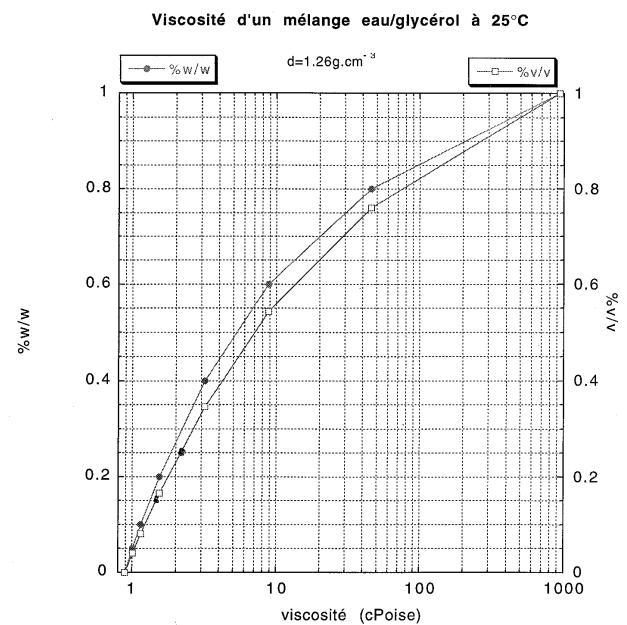


FIG. A.4: Variation de la viscosité d'un mélange eau-glycérol (d'après [Weast, 1989]).

Annexe B

Electroformation de vésicules géantes

La technique d'électroformation permet d'obtenir des GUVs à partir d'un dépôt lipidique hydraté sous champ électrique (voir §I.3.1.1). Cette technique a été adaptée par D. Lévy (Institut Curie, Paris) pour reconstituer la BR dans des vésicules géantes. L'idée est de cosolubiliser la BR et les lipides et de déposer le mélange sur une lame conductrice. L'originalité et la difficulté principale résident dans l'obtention du mélange lipides/protéines. Les lipides sont initialement solubilisés dans le chloroforme, alors que la BR est en solution aqueuse et se dénature dans le chloroforme. En revanche la BR est stable dans l'éther. Il faut donc d'abord resolubiliser les lipides dans l'éther avant d'effectuer le mélange puis le dépôt. Les différentes phases du protocole sont détaillées ci-dessous : préparation des lames conductrices, préparation des lipides et de la BR, mélange lipides/BR, dépôt sur les lames, séchage puis hydratation sous champ électrique et formation des GUVs.

B.1 Préparation des lipides et de la bactériorhodopsine

B.1.1 Préparation des lames d'ITO

Les lames d'ITO (Thomson, France) sont formées d'un dépôt conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde) d'épaisseur 100 nm et d'indice $n = 1.92$. La conductivité par unité de surface est de '15 Ω par carré', ce qui correspond à $200 \mu\Omega/\text{cm}$. Le côté conducteur est facilement reconnu à l'ohmmètre. Des espaces en téflon autocollant (Bytac, Polylabo) sont collés du côté conducteur de façon à former une chambre comme indiqué à la figure III.1.11, p. 157.

- Laver les deux lames d'ITO au chloroforme et à l'éthanol (frotter avec un papier optique, ou soniquer aux ultrasons dans un mélange chloroforme/éthanol).
- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher sous un flux azote, puis environ 10 minutes au four à vide ou à la pompe à palettes.
- Marquer l'endroit où sera fait le dépôt sur l'envers des lames. Placer les lames dans la

chambre froide à 4 °C.

B.1.2 Préparation des lipides

A partir des lipides en poudre EPC (Egg yolk L- α -Lecithin-(PhosphatidylCholine), 830051 Avanti Polar Lipids) et EPA (Egg Phosphatidic Acid, 830101, Avanti Polar Lipids), stockés sous argon à -80 °C, on fabrique une solution stock de lipides solubilisés dans le chloroforme à 10 mg/ml, stockée sous argon à -20 °C. Cette solution est diluée dans le chloroforme à 0.5 mg/ml et est stockée à -20 °C (pour les manipulations avec le chloroforme, utiliser de la verrerie en verre car le chloroforme dissout le plastique).

- Laisser les lipides (EPC ou EPA) à 0.5 mg/ml à température ambiante pendant environ 30 minutes.
- Prélever 1 ml d'EPC (ou 0.9 ml d'EPC et 0.1 ml d'EPA dans le cas de vésicules chargées négativement à 10% d'EPA) à l'aide d'une pipette en verre.
- Verser les 1 ml de lipides dans un petit ballon.
- Ranger les lipides à -20 °C.
- Evaporer pendant 1 heure à l'évaporateur rotatif (94200, Heidolph).
- Boucher le ballon avec un bouchon plastique troué.
- Sécher pendant 1 à 2 heures à la pompe à palettes (*Freeze Drying Chamber FDC 206, Savant*).
- Prélever 1 ml d'éther au 'pipetman' et cône plastique.
- Sortir le petit ballon de la pompe à palette. On doit observer un dépôt de lipides blanchâtre au fond du ballon.
- Ajouter rapidement les 1 ml d'éther aux lipides dans le petit ballon.
- Vortexer à température ambiante et vérifier que les lipides sont bien resolubilisés.
- Refroidir en plaçant le petit ballon dans la glace.

B.1.3 Préparation de la bactériorhodopsine

On dispose de suspensions concentrées de membrane pourpre purifiée, ne contenant donc quasiment que de la BR, à 18 mg/ml. Par dilution dans l'eau distillée, on obtient 2 ml de BR à 0.275 mg/ml que l'on redilue en aliquots de 80 μl . La BR est conservée congelée à -20 °C à l'abri de la lumière dans des petits tubes entourés d'aluminium. Pour éviter tout problème de séparation de phase lors du mélange avec les lipides qui se trouvent en solvant organique (éther), on élimine l'eau par lyophilisation.

- Laisser décongeler un aliquot de 80 μl à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant environ 30 minutes.

- Redisperser la BR décongelée par agitation et vortexation.
- Percer à l'aide d'une aiguille le bouchon du tube contenant la BR.
- Plonger le tube dans l'azote liquide.
- Attendre la congélation pendant quelques minutes.
- Placer rapidement le tube dans la pompe à palettes et évaporer sous vide (*Freeze Drying Chamber FDC 206*, Savant) pendant au moins 2 heures, en reconcentrant les vapeurs d'eau à l'aide d'un piège à vapeurs (*Refrigerated Vapor Trap*, RVT 400, Savant).
- Vérifier que la BR est bien lyophilisée et que l'eau ne s'est pas recondensée (on doit obtenir une poudre violette, sans glace ni eau).
- Sortir le tube de la pompe à palettes au dernier moment, juste avant le mélange avec les lipides.

La lyophilisation de la BR peut poser des problèmes. Un protocole plus simple, que nous avons utilisé au départ, permet d'éviter l'étape de lyophilisation en utilisant directement la BR concentrée à 18 mg/ml. Le mélange lipides/BR obtenu est moins homogène à cause de la présence d'eau. Ce protocole présente aussi l'inconvénient de consommer beaucoup de BR et nous ne le détaillerons pas plus.

B.2 Mélange lipides/BR

Cette étape est délicate. L'éther s'évapore rapidement : le mélange doit donc être rapide et efficace. Pour cela, le mélange est effectué à 0 °C à l'aide d'un sonicateur à pointe.

- Placer le tube contenant la poudre de BR lyophilisée dans la glace.
- Prélever, à partir du petit ballon refroidi dans la glace, 100 µl de lipides solubilisés dans l'éther.
- Les ajouter rapidement dans le tube de BR.
- Soniquer au sonicateur à pointe à faible puissance pendant environ 30 secondes, tout en maintenant le tube contenant les lipides et la BR dans la glace.

Une fois le mélange obtenu, le dépôt sur les lames d'ITO doit être fait le plus rapidement possible. Les rapports lipides/protéines indiqués ici correspondent à 80 lipides/BR.

B.3 Dépôt sur les lames conductrices

Si on veut fabriquer des vésicules purement lipidiques, il suffit de suivre les indications suivantes en remplaçant le mélange lipides/BR par des lipides solubilisés en chloroforme ou en éther. Les meilleurs dépôts sont obtenus avec des lipides solubilisés en éther.

- Dans la chambre froide à 4 °C, prélever 7.5 µl du mélange lipides/BR à l'aide d'une seringue en verre.
- Déposer rapidement le mélange sur les lames aux endroits marqués, de la façon la plus homogène possible. On peut déposer le mélange en tournant la seringue pour étaler la goutte de mélange. L'évaporation de l'éther est rapide même à 4 °C : on doit obtenir un dépôt bien visible formant des cercles concentriques irisés.
- Placer les lames à l'abri de la lumière, par exemple dans des boîtes recouvertes d'aluminium.
- Sécher les lames au four à vide, pendant au moins 3 heures, ou toute une nuit.

B.4 Formation des GUVs sous champ électrique

B.4.1 Préparation de la chambre de formation

La chambre d'électroformation est représentée dans le texte à la figure III.1.11. Les deux lames d'ITO sont assemblées face à face et les contacts sont assurés par des lames de cuivre autocollantes (EZ 7251, Radio Voltaire). L'épaisseur de la chambre est de 1 mm. L'étanchéité est réalisée par une pâte de scellement (Vitrex, Polylabo). On vérifie les contacts à l'ohm-mètre avant de passer à l'étape suivante.

B.4.2 Electroformation

Le champ électrique est contrôlé par une rampe (Varamsig) alimentée par un générateur basse fréquence (DCK DF 1641A, Conrad Electronic) et délivrant une tension alternative incrémentée toutes les 5 min de 20 mV à 1 V (voir Fig. B.1). Des constatations purement empiriques ont montré qu'une telle rampe de tension favorise et accélère l'électroformation. Nous avons remarqué qu'une fréquence de 20 Hz donne une croissance optimale des vésicules dans un milieu de viscosité voisine de celle de l'eau. Pour des milieux plus visqueux, la fréquence doit être abaissée à 5 Hz. La formation de GUVs prend environ 2 – 3 heures. On diminue ensuite la fréquence à 4 Hz en augmentant la tension à 1.5 V pour décoller les vésicules.

- Brancher le générateur et la rampe.
- Tester la rampe et vérifier que la tension délivrée varie de 20 mV à 1 V.
- Observer le dépôt sous microscope et vérifier son homogénéité.

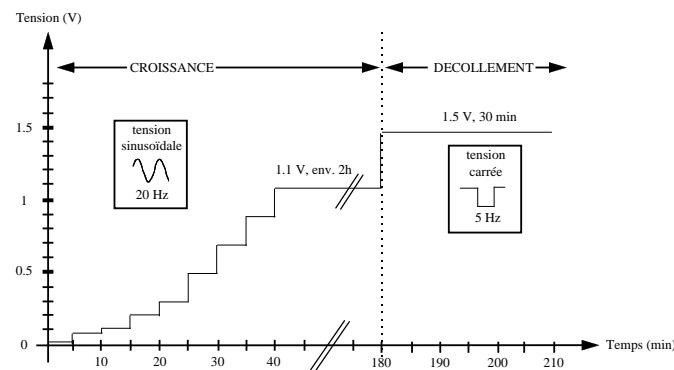


FIG. B.1: Variation de la tension appliquée au cours de l'électroformation des vésicules géantes.

- Remplir la chambre avec le milieu de formation (sucrose 50 mM, azide 1 mM et éventuellement sonde fluorescente pyranine, K⁺ ou glycérol) rapidement, en évitant les bulles.
- Fermer la chambre de fabrication à la pâte de scellement.
- Brancher rapidement les électrodes et la rampe de tension.
- Vérifier les contacts et la tension aux bornes de la chambre de formation au volt-mètre, surveiller la formation de bulles par électrolyse.
- Après 1 heure environ, la tension reste constante à 1 V. Attendre encore environ 1 à 2 heures. Vérifier au microscope la formation de GUVs.
- Baisser la fréquence à 4 Hz et augmenter la tension à 1.5 V pendant 15 – 20 minutes.
- Placer la chambre de formation à 4°C.

Annexe C

Marquage fluorescent de la bactériorhodopsine

Nous détaillons ici le protocole de marquage fluorescent de la BR par le FITC (fluorescein 5-isothiocyanate, isomer I, $M = 389.4$ g/mol, F 7520 Sigma, voir Fig. C.1) adapté de [Heberle and Dencher, 1992]. Le marquage s'effectue en deux étapes : le couplage fluorescent du FITC et de la BR et l'élimination de la sonde non couplée. Dans les conditions utilisées, on obtient un marquage de 0.7 – 1 molécule de FITC par BR [Heberle and Dencher, 1992].

C.1 Couplage BR-FITC

Le rapport molaire utilisé est de 50 moles de FITC pour 1 mole de BR : on mélange $75\mu\text{l}$ de FITC solubilisé dans le DMF (diméthylformamide) à 100 mM et 4 ml de BR dans un tampon Tris 50 mM à $pH = 8.5$ (2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol, $\text{C}_4\text{H}_11\text{NO}_3$, $M = 121.1$ g/mol, T 6791 Sigma) à 1 mg/ml.

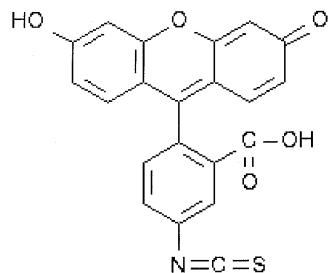


FIG. C.1: Formule chimique du FITC.

- Ajuster le pH d'une solution de Tris 50 mM à $pH = 8.5$ par addition de HCl.
- Prélever 3.8 ml du tampon Tris à $pH = 8.5$ et y ajouter $220\mu\text{l}$ de BR à 18 mg/ml. Centrifuger et resuspendre dans 4 ml de tampon Tris à $pH = 8.5$.
- Solubiliser 39 mg de FITC dans 1 ml de DMF, pour obtenir une concentration finale de 100 mM.
- Prélever $75\mu\text{l}$ de FITC solubilisé dans le DMF.
- Les ajouter à la solution de BR dans le tampon Tris.
- Agiter à température ambiante pendant 4 heures.

C.2 Rinçage de la BR et élimination de la fluorescence non couplée

Le mélange BR/FITC est rincé deux fois avec le tampon Tris par centrifugation (Optima TL Ultracentrifuge, Beckman) et resuspension. On le resuspend dans le tampon Tris puis on agite à 4°C pendant toute une nuit à l'aide d'un agitateur magnétique. On fait ensuite trois lavages avec une solution de KCl 200 mM, puis au moins trois lavages à l'eau distillée, par centrifugation (40000 trs/min, 4°C , 20 min). On constate que la fluorescence du surnageant diminue au fur et à mesure des lavages par des mesures au fluorimètre. A la fin, on contrôle l'état de la BR en traçant son spectre d'absorption (voir §III.1.4.1) et on vérifie que le marquage de la BR est correct en retrouvant le spectre de fluorescence du FITC ($\lambda_{exc} = 494$ nm, $\lambda_{em} = 519$ nm, voir §III.1.4.3, Fig. III.1.20). La fluorescence du FITC peut-être difficile à détecter à cause de la présence d'agrégats provoquant une inhibition de la fluorescence par 'self-quenching'. Pour vérifier le marquage, on prélève un petit échantillon de BR marquée dans lequel on ajoute un détergent, le Triton X100 : on retrouve alors bien le spectre du FITC.

Annexe D

Expériences de RICM

Nous nous sommes aussi intéressés au cas d'une membrane active fluctuant près d'une paroi. La description théorique correspondante a été détaillée au chapitre II.2. Nous avons utilisé le même modèle expérimental que précédemment - BR reconstituée dans des vésicules géantes - et la technique de RICM (*Reflexion Interference Contrast Microscopy*) pour essayer de mettre en évidence l'influence d'une paroi sur les fluctuations d'une membrane active. Le montage a été réalisé, mais nous avons pu constater que toutes les conditions expérimentales nécessaires pour obtenir des résultats interprétables n'ont pas encore été réunies. Nous avons cependant pu obtenir des résultats préliminaires qui nous ont permis de tester efficacement le montage et que nous allons présenter dans la suite de cette annexe.

D.1 Principe

Lorsqu'une vésicule fluctuante repose au-dessus d'une lamelle de verre, la distance qui la sépare de la lamelle est déterminée par l'équilibre entre plusieurs forces : gravité, force répulsive de Helfrich, forces de van der Waals et éventuellement, forces électrostatiques. Si cette distance est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la lumière, des interférences peuvent se produire entre la lumière réfléchie par la lamelle et celle réfléchie par la vésicule, lorsque la vésicule est éclairée en réflexion. C'est l'idée de base de la microscopie interférentielle par réflexion (RIM pour *Reflexion Interference Microscopy*), utilisée depuis longtemps en biologie pour observer l'adhérence de cellules sur un substrat de verre, ces observations étant le plus souvent très qualitatives [Curtis, 1964].

On peut cependant obtenir aussi des renseignements quantitatifs très intéressants [Gingell and Todd, 1979], surtout depuis l'introduction de la technique 'Antiflex', utile principalement dans le cas d'objets peu contrastés comme les vésicules car elle permet d'augmenter le contraste des franges d'interférence (d'où le nom de RICM) [Ploem, 1975, Rädler and Sackmann, 1993]. En effet, les anneaux de Newton observés révèlent les lignes d'égale distance h entre la vésicule et la lamelle. L'intensité des franges d'interférence permet de déduire

la distance de séparation $h(x, y, t)$ et donc de visualiser directement les fluctuations de forme de la membrane $u(x, y, t) = h(x, y, t) - \langle h(x, y, t) \rangle$. On peut ensuite remonter au spectre de fluctuations $\langle u(\mathbf{q}_-) \rangle^2$ par analyse de Fourier [Zilker et al., 1987, Rädler et al., 1995b]. Le RICM permet aussi de reconstruire en trois dimensions le profil d'objets près d'une paroi, avec une résolution latérale identique à celle de la microscopie optique, soit $0.2\text{ }\mu\text{m}$ et une résolution verticale de 1 nm [Wiegand et al., 1998]. On peut aussi mesurer, à l'aide du RICM, l'épaisseur de films minces à une précision de 0.2 nm [Rädler and Sackmann, 1993, Rädler et al., 1995a], et les forces répulsives entre un objet et une paroi à l'aide d'une analyse statistique de la distance de séparation entre l'objet et la paroi [Rädler and Sackmann, 1992, Rädler et al., 1995b].

D.1.1 Analyse théorique des expériences de RICM

Formation des images de RICM

Le principe de la formation des images est schématisé sur la figure D.1. La lumière réfléchie par la lamelle d'intensité I_1 et de phase ϕ_1 et celle réfléchie par la vésicule d'intensité I_2 et de phase ϕ_2 , peuvent interférer si les deux rayons réfléchis sont cohérents. En notant $k = 2\pi n/\lambda$ le vecteur d'onde de la lumière incidente où λ est sa longueur d'onde et $n = 1.33$ l'indice du milieu séparant la lamelle et la vésicule, θ l'angle d'incidence et $h(x, y, t)$ la distance séparant la vésicule et la lamelle, l'intensité des franges d'interférence est :

$$I(x, y, t) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[2kh(x, y, t) \cos \theta + \phi_2 - \phi_1]. \quad (\text{D.1})$$

Les intensités I_1, I_2 et les phases ϕ_1, ϕ_2 peuvent être calculées à partir de l'intensité I_0 et de la phase ϕ_0 de l'onde incidente par les formules de Fresnel :

$$\begin{aligned} I_1 &= r_{01}^2 I_0 \\ I_2 &= (1 - r_{01}^2)r_{12}^2 I_0, \end{aligned}$$

avec

$$\begin{aligned} r_{ij}^s &= \frac{n_i \cos \theta_i - n_j \cos \theta_j}{n_i \cos \theta_i + n_j \cos \theta_j} \\ r_{ij}^p &= \frac{n_j \cos \theta_i - n_i \cos \theta_j}{n_j \cos \theta_i + n_i \cos \theta_j}, \end{aligned}$$

pour les polarisations s et p, où n_i et n_j sont les indices de réfraction des couches i et j respectivement : $n_0 = n_v \simeq 1.49$ est l'indice du verre de la lamelle, $n_1 = n \simeq 1.33$ est l'indice du milieu et $n_2 = n_{mb} \simeq 1.5$ est l'indice de la bicouche lipidique. L'indice du verre étant plus élevé que celui du milieu environnant, le rayon réfléchi à l'interface verre-milieu ne présente aucun déphasage donc $\phi_1 = \phi_0$. En revanche, puisque la membrane a un indice optique plus élevé que celui du milieu, on s'attend à ce que le rayon réfléchi à l'interface milieu-membrane soit déphasé de π .

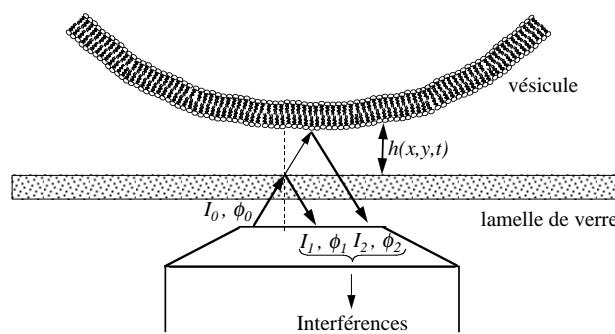


FIG. D.1: Principe de formation des images de RICM (contraste interférentiel par réflexion).

Pour une bonne visibilité des franges d'interférence, il faut être capable de faire interférer uniquement le rayon réfléchi par la lamelle et celui réfléchi par la vésicule, et d'éviter les réflexions multiples entre la vésicule et la lamelle. Pour cela, les deux rayons réfléchis ne doivent pas être totalement cohérents. La source lumineuse utilisée en RICM est bien monochromatique mais n'est pas ponctuelle : elle est donc temporellement cohérente, mais spatialement incohérente. La source large du microscope est focalisée sur la préparation par l'objectif, avec une ouverture numérique d'illumination (ONi) définie par $ONi = n \sin \alpha$ où α est l'angle des rayons les plus inclinés qui entrent dans le milieu. Les rayons lumineux issus de la source ne sont donc pas en incidence normale ($\theta \neq 0$) et l'équation D.1 dépend de θ . On peut tenir compte de l'incohérence spatiale de plusieurs façons : par un effet d'ouverture numérique non nulle, en intégrant sur tous les angles θ [Gingell and Todd, 1979, Rädler and Sackmann, 1993] ou par un effet de cohérence partielle, en introduisant la fonction de cohérence mutuelle des deux rayons Γ_{12} dans l'équation D.1 et en utilisant le théorème de van Citter-Zernike [Rädler and Sackmann, 1993]. La résolution complète du problème est numérique [Gingell and Todd, 1979], mais une solution analytique peut être trouvée en faisant l'hypothèse que la distribution d'éclairage de la source est donnée par une fonction rectangulaire : $I(\theta) = 0$ si $\theta > \alpha$ et $I(\theta) = I_0$ si $\theta \leq \alpha$ [Rädler and Sackmann, 1993]. L'équation D.1 devient alors :

$$I(x, y, t) = 4\pi \sin^2 \alpha / 2 \left[I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \frac{\sin(\tilde{h})}{\tilde{h}} \cos [2kh(x, y, t) + \phi_2 - \phi_1 - y] \right], \quad (\text{D.2})$$

avec $\tilde{h} = 2kh(x, y, t) \sin^2 \alpha / 2$. Le contraste des franges d'interférence, défini comme $v = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$ vaut donc :

$$v = \frac{2\sqrt{I_1 I_2} \sin(\tilde{h})}{I_1 + I_2} \frac{\tilde{h}}{\tilde{h}}.$$

Le contraste des franges dépend donc de l'ouverture numérique ONi et de la distance entre la vésicule et la lamelle. Il diminue si l'ouverture numérique augmente et si la vésicule s'éloigne de

la lamelle. Pour une meilleure visibilité des franges, on aura donc intérêt à diminuer l'ouverture numérique en fermant le diaphragme d'ouverture : même si on perd un peu de résolution spatiale, cela permettra d'augmenter la profondeur de champ. Pour une longueur d'onde $\lambda = 550$ nm, une ouverture numérique de l'ordre de $ONi = 0.5$ et une distance entre la vésicule et la lamelle de l'ordre de 50 nm, on trouve $\tilde{h} \simeq 4 \times 10^{-2}$. La correction due à la cohérence partielle est donc petite si l'ouverture numérique est suffisamment faible et si la vésicule est proche de la lamelle. Dans la suite, nous ne nous intéresserons pas aux franges d'ordre supérieur, pour lesquelles la correction n'est plus négligeable. On utilisera donc l'équation approchée D.1 en incidence normale ($\theta = 0$) pour relier l'intensité I des franges d'interférence à la distance séparant la vésicule et la lamelle :

$$I(h(x, y, t)) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos [2kh(x, y, t) + \phi_2 - \phi_1]. \quad (\text{D.3})$$

Dans le cas d'une membrane de faible épaisseur, $e \simeq 5$ nm, on doit tenir compte des réflexions sur les deux surfaces de la membrane : on trouve que le déphasage du rayon réfléchi par la membrane vaut $\phi_2 \simeq \phi_0 + \pi/2 + 2ke$ [Rädler and Sackmann, 1993]. On a alors $\phi_2 - \phi_1 = \pi/2 + 2ke \simeq \pi/2$, puisque $2ke \simeq 0.1 \ll \pi/2$. La courbe donnant l'intensité I en fonction de la distance de séparation h , calculée à partir de l'équation D.2 est représentée à la figure D.2. Lorsque la vésicule est en contact avec la lamelle ($h = 0$), l'intensité est égale à l'intensité moyenne des franges d'interférence. On voit que pour des distances comprises entre 0 et 100 nm, l'intensité n'est pas monotone, puisqu'elle présente un minimum vers $h = 50$ nm, et ne permet pas de déduire la distance h de façon univoque. Cela pose problème pour l'étude de membranes près d'une paroi, notamment si on cherche à mesurer précisément la distance de séparation entre la membrane et la paroi. La solution consiste à décaler les franges d'interférence grâce à un dépôt sur la lamelle d'une couche diélectrique d'indice n_d et d'épaisseur d tels que $\phi_2 - \phi_1 = \pi$ soit : $d = \lambda/8n_d + en/n_d$. Ce diélectrique peut de plus jouer un rôle d'adaptateur d'indice entre le verre et le milieu si $n_v = 1.49 > n_d > n = 1.33$. On utilise en général une épaisseur de 55 nm de MgF₂ (fluorure de magnésium) d'indice 1.39. La courbe représentant I en fonction de h lorsque la lamelle est traitée au MgF₂ est donnée sur la figure D.2. On voit que le contact entre la vésicule et la lamelle donne une intensité minimale et que jusque vers 100 nm, l'intensité croît avec la distance. Cette fois, entre 0 et 100 nm, une intensité donnée correspond à une distance de séparation unique.

La différence d'indice entre le milieu et la bicoche lipidique est faible et l'intensité lumineuse réfléchie par la vésicule est de l'ordre de $10^{-3} I_0$. Les franges d'interférence sont donc très facilement altérées par les réflexions parasites dues à la lumière directe ou bien aux réflexions multiples lors du passage de la lumière à travers le microscope. Pour éviter ces réflexions parasites et ne faire interférer que les deux rayons qui nous intéressent, on utilise une technique en lumière polarisée dite 'Antiflex'. Le schéma est représenté sur la figure D.3. La lumière issue de la source d'illumination est polarisée linéairement par passage à travers un polariseur. L'objectif Antiflex possède à sa sortie une lame quart d'onde qui polarise la lumière circulairement. Après réflexion sur la lamelle ou sur la vésicule, les directions de polarisation ont tourné de $\pi/2$. La lumière repasse à travers l'objectif qui polarise de nouveau la lumière linéairement, mais dans une

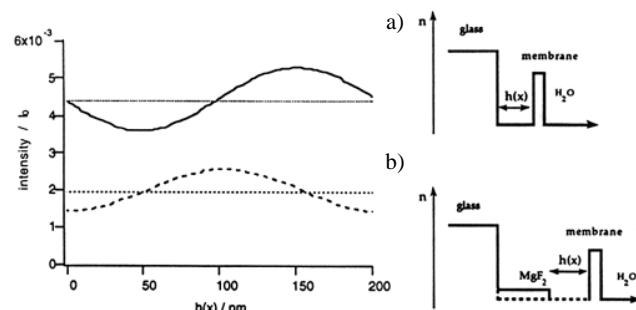


FIG. D.2: Variation de l'intensité des franges d'interférence en fonction de la distance h de séparation entre la vésicule et la lamelle de verre. a) Sans dépôt de MgF₂. b) Avec un dépôt de 55 nm de MgF₂.

direction tournée de $\pi/2$. Un analyseur placé à la sortie du microscope et croisé avec le polariseur permet de ne laisser passer que la lumière ayant été réfléchie par la lamelle ou par la vésicule et de bloquer la lumière directe et les réflexions parasites. Cette technique est indispensable pour obtenir des franges d'interférence contrastées à partir de la réflexion sur une vésicule lipidique.

Analyse de Fourier et obtention du spectre de fluctuations

L'équation D.3 peut être inversée de façon univoque pour des distances de séparation comprises entre 0 et 100 nm. On obtient alors l'expression de la distance de séparation h en fonction de l'intensité I :

$$h(x, y, t) = \frac{\lambda}{4\pi n} \left[\arccos \left[\frac{2I(x, y, t) - (I_{\max} + I_{\min})}{I_{\max} - I_{\min}} \right] + \phi_1 - \phi_2 \right] \quad (\text{D.4})$$

Le spectre de fluctuations de $u(x, y, t) = h(x, y, t) - \langle h(x, y, t) \rangle$ est ensuite obtenu par transformation de Fourier. Contrairement à la définition donnée dans la partie théorique (§I.1.2.2, Eq. I.1.4, p. 14), la transformée de Fourier $u(\mathbf{q}_-, t)$ utilisée ici a la même dimension que $u(\mathbf{r}_-, t)$:

$$\begin{aligned} u(\mathbf{q}_-, t) &= \frac{1}{A} \iint u(\mathbf{r}_-, t) \exp(-i\mathbf{q}_- \cdot \mathbf{r}_-) d^2 \mathbf{r}_- \\ u(\mathbf{r}_-, t) &= \frac{A}{(2\pi)^2} \iint u(\mathbf{q}_-, t) \exp(i\mathbf{q}_- \cdot \mathbf{r}_-) d^2 \mathbf{q}_-. \end{aligned} \quad (\text{D.5})$$

Cette définition fait intervenir l'aire totale de membrane considérée A dans le spectre de fluctuations, puisque l'on a alors, en appliquant le théorème d'équipartition dans l'approximation harmonique pour le potentiel V d'interaction entre la vésicule et la paroi [Rädler et al., 1995b] :

$$\langle u(q_-)^2 \rangle = \frac{kT}{A(\kappa q_-^4 + \sigma q_-^2 + V'')} \quad (\text{D.6})$$

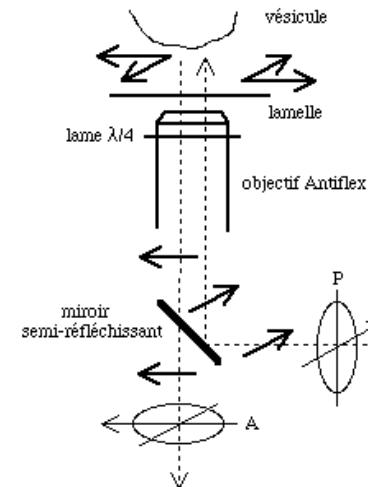


FIG. D.3: Technique 'Antiflex' permettant d'améliorer le contraste des franges d'interférence formées par une vésicule.

où $V'' = 2(\partial^2/\partial h^2)V_{h=\langle h \rangle}$ est la dérivée seconde du potentiel d'interaction V prise en $\langle h \rangle$, distance moyenne de séparation entre la vésicule et la paroi. En présence d'interactions avec la paroi, on s'attend donc à observer trois régimes de fluctuations. Si $q_- < \sqrt{V''/\sigma}$, le spectre de fluctuations doit être plat. Pour $\sqrt{V''/\sigma} < q_- < \sqrt{\sigma/\kappa}$, on doit observer la loi de puissance en $1/q_-^2$ dominée par la tension. Enfin, si $q_- > \sqrt{\sigma/\kappa}$, le terme de courbure domine et on s'attend à une décroissance en $1/q_-^4$. Tout ceci suppose $\sqrt{V''/\sigma} < \sqrt{\sigma/\kappa}$. Si l'interaction de Helfrich domine l'expression du potentiel d'interaction V de sorte que $V'' \propto (kT)^2/\kappa d^4$ pour $\sigma \rightarrow 0$, alors la condition précédente impose $\sigma > kT/d^2$. Pour une distance de séparation de l'ordre de 50 nm, on trouve $\sigma > 10^{-6} \text{ N/m}$, ce qui est en général toujours vrai pour une vésicule près d'une paroi.

Seule la zone où la membrane fluctue près de la paroi, entre les franges d'ordre 0 et 1, peut être utilisée pour calculer le spectre de fluctuations. La membrane est alors approximativement plane et on peut utiliser l'équation D.6 pour interpréter les résultats. On effectue la transformation de Fourier directement sur $h(\mathbf{r}_-, t)$ pour obtenir $h(\mathbf{q}_-, t)$. Puis on calcule $|h(\mathbf{q}_-, t)|^2 = h(\mathbf{q}_-, t)\bar{h}(\mathbf{q}_-, t)$. La moyenne statistique $\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$ sera ensuite obtenue en moyennant $|h(\mathbf{q}_-, t)|^2$ dans le temps.

D.1.2 Montage expérimental

Le but est d'obtenir des images de RICM d'une vésicule peu tendue et non adhérente n'interagissant avec la lamelle que par la force répulsive. A partir des franges d'interférence d'ordre le plus bas, entre l'ordre 0 et l'ordre 1, on peut mesurer la distance de séparation $h(x, y, t)$ entre la vésicule et la lamelle. On en déduit ensuite la distance moyenne de séparation $\langle h \rangle$ ainsi que le spectre de fluctuations $\langle h(\mathbf{q}_-) \rangle^2$ de la vésicule. Sur une même vésicule, on veut comparer le cas passif où la BR est éclairée en rouge et ne pompe pas de protons au cas actif où la BR pompe des protons en lumière jaune. On espère ainsi voir la signature de l'activité par une modification du spectre de fluctuations.

Visualisation des vésicules en RICM

Le montage est réalisé sur le même microscope inversé que précédemment (voir §III.2.1.2). L'éclairage en transmission est utilisé pour localiser les vésicules en contraste de phase. L'éclairage en réflexion sert à la fois à contrôler la fluorescence des vésicules, excitée par le même laser argon qu'au paragraphe §III.2.1.2, et à former les images de RICM. La lumière entre à l'arrière du microscope, puis dans l'objectif grâce à une lame semi-réfléchissante, 03 BTF 001, Melles-Griot) placée dans le coulissoir du microscope, se réflechit sur la lamelle et la vésicule, repasse dans l'objectif et à travers la lame semi-réfléchissante, puis est dirigée vers la sortie du microscope.

On dispose de deux sources d'éclairage par réflexion pour former les images de RICM : un laser rouge hélium-néon de 20 mW, à 632.8 nm (GLG 5400, Melles-Griot), une lampe mercure de 50 W (HBO 50W, Zeiss). L'une et l'autre présentent des avantages et des inconvénients pour les expériences que nous voulons réaliser.

La lampe mercure est la source classiquement utilisée en RICM. On obtient une lumière quasi-monochromatique grâce à un filtre interférentiel (546.1 nm, $\delta\lambda = 10$ nm, 03 FIM 006, Melles-Griot) adapté à la raie verte du mercure. La source est large et intense, et il suffit de régler l'homogénéité du champ d'éclairage pour obtenir facilement des franges d'interférence. Mais le montage de la lampe sur l'arrière du microscope bloque le passage du faisceau du laser argon et ne permet pas de mesurer l'intensité de fluorescence I_F comme précédemment. Il faut pour cela utiliser un bloc de fluorescence pour l'excitation du FITC adapté à la lampe mercure. De plus, la longueur d'onde de la raie verte du mercure est très proche du maximum d'absorption de la BR (voir Fig. D.4). La lumière utilisée pour former les images de RICM activera donc toujours le pompage de la BR et nous ne disposerons d aucun moyen pour comparer cette situation, sur une même vésicule, à la situation passive où la BR ne pompe pas. Nous avons tout de même utilisé l'éclairage avec la lampe mercure pour tester le montage de RICM sur des vésicules purement lipidiques, et retrouver les résultats connus pour le spectre de fluctuations [Rädler et al., 1995b]. Nous avons aussi essayé de comparer de façon statistique ces résultats obtenus pour des vésicules purement lipidiques à ceux obtenus sur une population de vésicules contenant de la BR activée

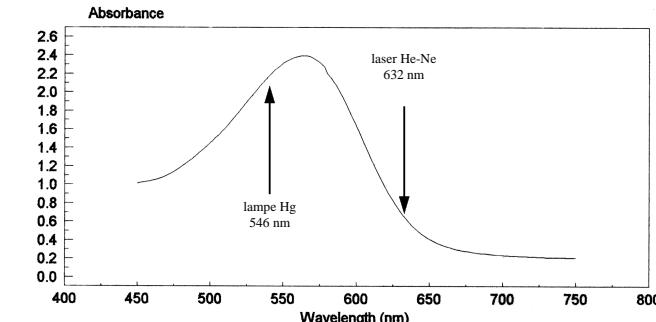


FIG. D.4: Position des longueurs d'onde de la raie verte du mercure et de la raie rouge du laser He-Ne sur le spectre de la BR.

par la lumière de la lampe mercure.

Le laser He-Ne semble beaucoup mieux adapté au problème de la comparaison, sur une même vésicule, des cas passif et actif. On peut en effet former les franges d'interférence en rouge sans activer le pompage de la BR, puis ajouter une lumière jaune sur le trajet de l'éclairage en transmission. Cette lumière jaune peut ensuite être éliminée par un filtre interférentiel rouge (632 nm, $\delta\lambda = 10$ nm, D43133 Edmund Scientific) qui ne laisse passer que la lumière du laser et permet de visualiser uniquement les franges d'interférence. La fluorescence des vésicules peut aussi être facilement mesurée si le laser argon et le laser He-Ne empruntent le même chemin. La lumière laser pose pourtant plusieurs problèmes liés à sa forte cohérence spatiale et temporelle. Comme nous l'avons souligné plus haut, la formation des images en RICM nécessite une faible cohérence spatiale. Il faut donc élargir et décorreler le faisceau laser pour éliminer le grain ('speckle'). Ceci est réalisé grâce à un dispositif connu sous le nom de 'Scrambler' (Technical Video Ltd, USA). Le laser est couplé à une fibre optique. Cette fibre est vibrée pour éliminer le 'speckle' puis couplée au microscope à l'aide d'une optique permettant d'élargir le faisceau. Pour vibrer la fibre, nous avons utilisé un petit moteur électrique tournant à une fréquence de l'ordre de 10 Hz et la membrane d'un haut-parleur dont l'intensité et la fréquence de vibration peut être contrôlée pour réduire le 'speckle' au maximum. De plus, la forte cohérence temporelle du laser ($\delta\lambda < 1$ nm) provoque l'apparition de franges d'interférence parasites qui se superposent aux franges du RICM. Par exemple, le traitement de surface de la lame semi-réfléchissante donne naissance à un réseau de franges horizontales. Ces franges parasites sont très floues et à peine visibles lorsque la mise au point est réglée sur les franges du RICM. Nous ne les avons donc pas prises en compte dans notre traitement des images, bien qu'un filtrage spatial des images puisse les éliminer simplement.

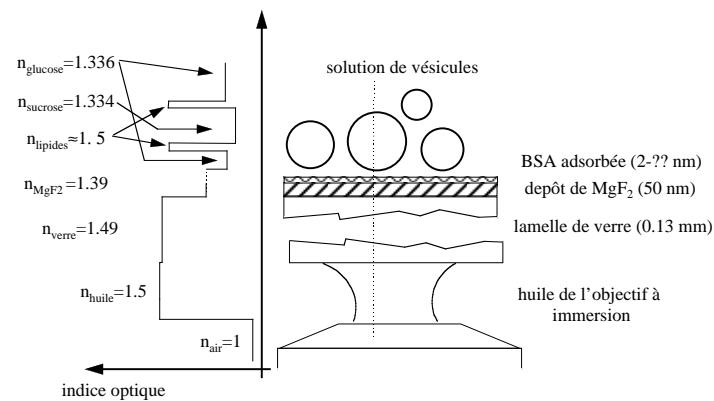


FIG. D.5: Traitement et indices des différents dioptrés impliqués dans la formation des images de RICM.

Technique Antiflex

La technique Antiflex a été décrite au paragraphe précédent (§D.1.1). Nous avons donc placé un polariseur avant la lame semi-réfléchissante sur le trajet avant réflexion, et un analyseur après celle-ci sur le trajet après réflexion. Le polariseur et l'analyseur sont croisés en observant la préparation à l'aide d'un objectif classique sans lame quart-d'onde. Puis, les franges d'interférence sont visualisées avec un objectif à immersion x63 comportant à sa sortie une lame quart-d'onde réglable (N.A. 1.25 oil Ph3 Antiflex Plan Neofluar, Zeiss). La position de la lame quart-d'onde est ajustée pour obtenir un contraste des franges maximal.

Chambre d'observation et choix des vésicules

Les vésicules sédimentent dans la même chambre thermostatée que celle décrite plus haut (voir §III.2.1.2). Cette fois-ci, la lame formant le côté inférieur de la chambre a été traitée au MgF₂. Un dépôt de 55 nm a été effectué par déposition sous vide en phase vapeur (ICMC Innovation Couches Minces, France). Pour éviter l'adhérence des vésicules sur le MgF₂, les lamelles sont ensuite traitées à la BSA 0.1% pendant 20 – 30 minutes (voir Fig. D.5). On choisit ensuite les vésicules les plus grosses et les moins tendues. La zone où la membrane fluctue près de la paroi, entre la frange d'ordre 0 et celle d'ordre 1 doit être suffisamment grande pour permettre un bon traitement d'image (voir ci-dessous).

Acquisition et traitement informatique des images

Les images des franges d'interférence sont enregistrées par la caméra CCD utilisée pour les expériences de micropipettes puis traitées en temps réel par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition (Meteor, Matrox) et d'un programme écrit en C++ sous Windows NT. Les routines de vérification du dialogue en temps réel entre la carte et le PC ont été écrites par K. Ritchie (UBC, Vancouver, Canada). L'acquisition des images est effectuée en temps réel puis les images sont analysées pour obtenir le spectre de fluctuations $\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$ en fonction du vecteur d'onde \mathbf{q}_- . L'algorithme utilisé est détaillé dans l'annexe E et nous donnons ci-dessous les grandes lignes de la méthode.

Une sélection de $2^n \times 2^n$ pixels est nécessaire pour effectuer une transformation de Fourier rapide. Selon la taille et la tension des vésicules, la zone de fluctuations utilisable pour le calcul du spectre de fluctuations varie. Nous avons pu effectuer des sélections de 128 × 128 pixels, 256 × 256 pixels, ou 512 × 512 pixels, correspondant à des tailles de $A = 16 - 66 - 262 \mu\text{m}^2$ puisque 1 pixel correspond à $\text{pix} = 0.1 \mu\text{m}$. Les images sont stockées en temps réel à la cadence vidéo de 25 images/seconde. Le nombre total d'images capturées N doit être adapté à la taille de la sélection $2^n \times 2^n$ pixels de sorte que la mémoire ne sature pas et que l'acquisition reste en temps réel (voir annexe E). Pour une image donnée au temps t_i , le programme recherche le minimum et le maximum de l'intensité des franges sur toute l'image du réseau de franges, et en déduit $h(x, y, t_i)$ par la formule d'inversion D.3. Le spectre $\langle h(\mathbf{q}_-, t_i)^2 \rangle$ est ensuite calculé par transformation de Fourier discrète (voir annexe E), puis moyenné sur les N images, pour obtenir le spectre de fluctuations $\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$. Le domaine de vecteurs d'onde sondés par cette méthode est compris entre $q_{max} = 2\pi/\text{pix} = 6.3 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$ et $q_{min} = 2\pi/(npix) = 5 - 2.5 - 1.2 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$ pour des sélections de 128 × 128 pixels, 256 × 256 pixels, ou 512 × 512 pixels respectivement.

D.1.3 Problèmes expérimentaux

Interactions avec la paroi

Le but des expériences est d'étudier la force hors équilibre répulsive exercée par une paroi sur une membrane active. On doit donc s'assurer que les interactions entre la paroi et la vésicule sont bien dominées par la force hors équilibre (voir §I.1.2.3). Dans nos expériences, les vésicules sont soumises *a priori* à quatre forces qui déterminent le potentiel V défini à l'équation D.6 : la gravité à cause de la différence de densité entre l'intérieur et l'extérieur, les forces de van der Waals entre la membrane et le substrat, les forces électrostatiques et la force répulsive de Helfrich ou son équivalent hors équilibre. Si les interactions attractives sont suffisamment fortes, la vésicule peut adhérer au substrat et se mettre sous tension [Rädler et al., 1995b]. L'amplitude des fluctuations de la vésicule est alors très réduite ce qui rend impossible l'analyse spectrale des fluctuations par RICM. On doit donc éviter à tout prix l'adhérence des vésicules sur le substrat.

Sur du verre nu, les vésicules, même purement lipidiques, n'adhèrent pas. Pour les vésicules

contenant de la BR et donc chargées négativement, cette observation n'est pas très surprenante puisqu'une surface de verre propre est en général aussi chargée négativement. Pour les vésicules neutres d'EPC pur, cela peut paraître plus étonnant. Même si l'EPC est zwitterionique, il est de plus en plus souvent admis que la charge nette d'une membrane d'EPC est légèrement négative à pH neutre ([Rädler and Sackmann, 1992]). Sur du verre traité au MgF₂, les vésicules adhèrent fortement, certainement à cause de charges positives présentes à la surface du MgF₂, le MgF₂ étant légèrement soluble dans l'eau. La présence de 2 mM de sels potassiques n'écrante pas suffisamment cette interaction électrostatique. La façon classique de résoudre ce problème est d'adsorber de la BSA sur le MgF₂ [Rädler et al., 1995b]. Pour des vésicules purement lipidiques, il suffit de tremper les lamelles dans une solution diluée de BSA (10 µg/ml soit 10⁻³ % en masse) pendant 15 min. Après rinçage, l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée est de l'ordre de 2 nm [Rädler et al., 1995b] et est faible devant l'épaisseur de la couche de MgF₂. Cette épaisseur de BSA est légèrement plus faible que celle d'une monocouche de BSA, ce qui suggère que la couche n'est pas homogène et possède peut-être des trous. En revanche, pour des vésicules contenant de la BR, cette méthode n'est pas satisfaisante et les vésicules adhèrent malgré le traitement. Les interactions électrostatiques, dues aux charges négatives portées par la BR, sont là encore certainement responsables de cet effet. Nous avons donc progressivement augmenté la durée du traitement à la BSA jusqu'à 30 min, durée pour laquelle l'adhérence devient négligeable. Il semble alors que la couche ne contienne plus de trous ou bien que plusieurs couches de BSA s'adsorbent empêchant l'adhérence des vésicules.

Ce traitement à la BSA complique nettement l'interprétation des expériences. Une fois les conditions mises au point, nous avons toujours traité les lamelles avec la même concentration de BSA (10 µg/ml) pendant la même durée (30 min). Malgré cela, l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée n'est pas bien contrôlée et, si son épaisseur n'est plus négligeable devant celle de la couche de MgF₂, la distance moyenne séparant la vésicule et la lamelle augmente (voir Fig. D.5). D'après la courbe représentative de I en fonction de h (voir Fig. D.2), on voit que si la distance de séparation dépasse 100 nm, l'intensité I ne définit plus une hauteur h de manière univoque et l'analyse des fluctuations de hauteur à partir de la formule D.4 n'a plus de sens. Comme nous l'avons signalé, le contraste des franges diminue si la vésicule s'éloigne de la lamelle (voir Eq. D.2) : plus la couche de BSA sera épaisse, moins les franges d'interférence seront visibles. Un dernier problème lié à l'adsorption de BSA concerne les interactions entre la membrane lipidique et la BSA. A pH ≈ 7, la BSA est chargée négativement. Les interactions électrostatiques répulsives entre le substrat et la vésicule peuvent donc exister et compliquer l'analyse des expériences.

Bruit et traitement d'images

Pour obtenir des renseignements quantitatifs à partir des analyses spectrales des fluctuations, les images de RICM doivent être de la meilleure qualité possible. Les images de RICM obtenues à l'aide du laser He-Ne sont beaucoup plus bruitées que celles obtenues avec la lampe mercure, malgré le système de 'Scrambler' utilisé pour éliminer le speckle. L'intensité du laser est plus

faible que celle de la lampe et la caméra CCD est moins sensible dans le rouge, d'où un rapport signal/bruit plus bas dans le cas du laser. Nous avons toujours cherché à minimiser le bruit dans les images de RICM, en réglant l'homogénéité du champ pour l'éclairage avec la lampe mercure, et en optimisant le couplage au microscope pour l'éclairage laser.

Le traitement des images pose aussi plusieurs problèmes techniques. La carte d'acquisition possède un filtre passe-bas qui coupe les fréquences supérieures à 3 MHz et lit les données de la caméra de manière séquentielle, ligne par ligne. Cela explique pourquoi la transformée de Fourier d'une image noire lue par la carte est non triviale. Ces problèmes sont inhérents à la carte d'acquisition et ne peuvent pas être évités. Le tramage de l'image vidéo en deux trames paire et impaire ajoute un bruit, difficile à éliminer, aux grands vecteurs d'onde sur les transformées de Fourier. Enfin, les effets de taille finie entraînent un élargissement des pics de Fourier et l'apparition de pics secondaires d'ordre supérieur aux grands vecteurs d'onde. Ces effets peuvent être diminués par apodisation du signal initial. Cependant, à cause de la petite taille de nos sélections 2ⁿ × 2ⁿ pixels et du faible rapport signal/bruit, nous avons constaté que l'apodisation provoque une forte baisse de signal : nous avons donc travaillé sur les données brutes non apodisées.

Les temps caractéristiques des modes de fluctuations doivent être comparés au temps d'intégration de la caméra CCD. Les modes les plus rapides, c'est-à-dire les modes à grands vecteurs d'onde $q \simeq 10^{10} \text{ m}^{-1}$ (voir Eq. I.1.34, p. 27) ont des temps caractéristiques de l'ordre de $\tau^{-1} = \kappa d^3 q^6 / 12\eta \simeq 10^{-22} \text{ s}$, avec $d = 100 \text{ nm}$, très courts devant la fréquence vidéo de 50 Hz. Les fluctuations de grands vecteurs d'onde sont donc moyennées dans le temps. Ceci est d'autant plus vrai que l'intensité de l'image reçue est faible, puisque lorsque la caméra CCD est utilisée en gain automatique, le temps d'ouverture du diaphragme augmente. Ce temps d'ouverture peut varier de 1/100000 s à 1/50 s. Plusieurs effets (tramage, effets de taille finie, temps d'intégration) se conjuguent pour produire des artefacts aux grands vecteurs d'onde : nous avons donc limité l'étude des spectres obtenus aux vecteurs d'onde inférieurs à 10⁷ m⁻¹.

D.2 Premiers résultats

D.2.1 Formation des images de RICM et description des expériences

Quelques exemples d'images de vésicules sont montrés à la figure D.6. Les vésicules tendues forment des franges très concentriques immobiles. Le RICM permet de détecter facilement les vésicules adhérentes, puisque la zone d'adhérence apparaît grise. Pour l'analyse des fluctuations, on choisit les vésicules peu tendues, pour lesquelles les franges d'interférence sont distordues et fluctuantes, et non adhérentes, pour lesquelles aucune zone de contact grise n'est visible.

Comme nous l'avons signalé plus haut, les images obtenues avec le laser He-Ne sont plus buitées que celles obtenues avec la lampe mercure (voir Fig.D.7). Nous avons donc effectué deux types d'expériences différentes. L'utilisation de la lampe mercure ne permet pas de comparer sur la même vésicule les situations active et passive (voir §D.1.2), alors que le laser rend possible

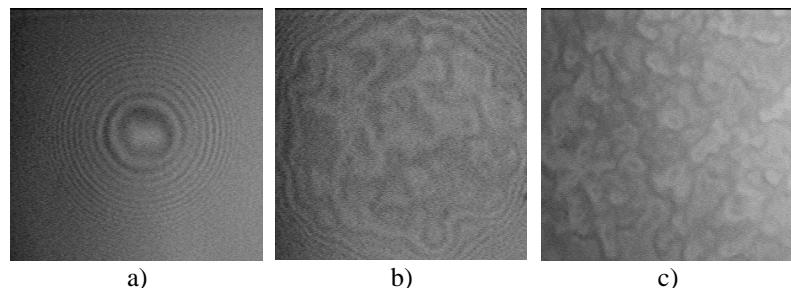


FIG. D.6: Exemples d'images de RICM obtenues avec la lampe mercure. a) Vésicule tendue. b) Vésicule fluctuante. c) Exemple de sélection utilisée pour l'analyse spectrale.

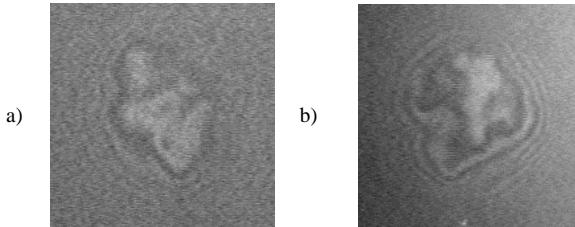


FIG. D.7: Comparaison des images de RICM obtenues sur la même vésicule avec la lampe mercure et avec le laser He-Ne. a) Laser He-Ne. b) Lampe mercure.

cette comparaison, mais fournit des images de moins bonne qualité.

Expériences avec la lampe mercure

Avec la lampe mercure, nous avons essayé de comparer de façon statistique le comportement d'une population de vésicules purement lipidiques (donc forcément passives) à celui d'une population de vésicules contenant de la BR (donc actives, puisque ce type d'éclairage excite le pompage de la BR). Pour éviter les problèmes dus à l'épaisseur de BSA (voir §D.1.3), nous avons préparé les chambres d'observation des deux populations de vésicules en parallèle, en traitant les lamelles de la même façon. On sait que, statistiquement, la BR est bien incorporée dans la bicouche lipidique des vésicules (voir §III.1.4.3), mais, pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu mesurer la fluorescence I_F des vésicules étudiées.

Expériences avec le laser He-Ne

Avec le laser He-Ne, nous avons essayé d'observer un effet de l'activité sur la même vésicule. L'éclairage rouge du laser permet d'effectuer le contrôle sur la membrane passive. Puis, en ajoutant une lumière jaune grâce à l'éclairage en transmission et le filtre passe-haut jaune utilisé dans les expériences de micropipettes (voir §III.2.1.2, on peut activer le pompage de la BR).

Lorsque la lumière jaune est ajoutée, l'image en transmission se superpose à celle des franges d'interférence formées en réflexion. On limite ce problème en plaçant un filtre interférentiel rouge à 632 nm à l'entrée de la caméra. L'image en transmission est alors très affaiblie mais pas totalement éliminée puisque le filtre passe-haut jaune laisse passer les longueurs d'onde supérieures à 550 nm (voir Fig. III.1.13).

Le traitement de surface ne pose ici aucun problème lors de la comparaison entre les expériences actives et passives puisqu'elles sont effectuées sur la même vésicule. Rappelons aussi que l'on peut au préalable vérifier la fluorescence I_F de la BR marquée au FITC.

D.2.2 Spectre de fluctuations

Spectre de fluctuations passif

Nous avons cherché à retrouver les résultats classiques obtenus pour le spectre de fluctuations d'une vésicule purement lipidique par la technique de RICM [Rädler et al., 1995b]. Lorsque la lampe mercure sert de source pour former les franges d'interférence, le rapport signal/bruit est élevé et le programme fournit des spectres de fluctuations peu bruités. Par des ajustements linéaires de $\ln h^2$ en fonction de $\ln q$, où q et h sont exprimés en nm, on observe typiquement les différents régimes suivants (voir Fig. D.8) :

- Pour $-7.5 < \ln q < -6.5$, pente -2.0 ± 0.8 .
- Pour $-6.5 < \ln q < -6$, pente -2.5 ± 0.6 .
- Pour $-6 < \ln q < -5$, pente -3 .

Ces valeurs varient d'une préparation de vésicules à l'autre, et d'une vésicule à l'autre pour une même préparation. Les barres d'erreur indiquées ci-dessus traduisent ces variations pour 15 vésicules.

On peut aussi essayer d'ajuster les courbes expérimentales en imposant les exposants pour déterminer les paramètres V'' , σ et κ . Ajuster les trois constantes à la fois n'est pas possible car l'algorithme converge très difficilement. En revanche, on peut fixer le module de courbure à sa valeur déduite des expériences de micropipettes : $\kappa = 10 kT$. Les ajustements sur V'' et σ donnent des valeurs typiques de $V''/kT = 0.1 - 5 \times 10^{-9} \text{ J}.\text{nm}^{-4}$ et $\sigma = 1 - 5 \times 10^{-3} \text{ J}.\text{nm}^{-2}$. Ces valeurs correspondent à $V'' \simeq 0.4 - 20 \times 10^6 \text{ J}.\text{m}^{-4}$ et $\sigma = 4 - 20 \times 10^{-6} \text{ J}.\text{m}^{-2}$. Avec le laser, les exposants trouvés, pour la même vésicule purement lipidique, sont systématiquement plus faibles qu'avec la lampe mercure (voir Fig. D.9). Les différents régimes sont plus difficiles à

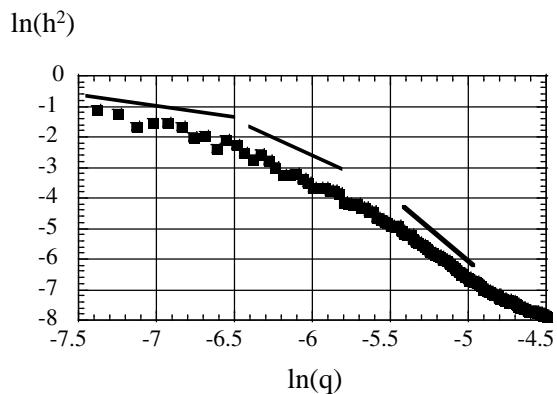


FIG. D.8: Spectre de fluctuations d'une vésicule purement lipidique obtenu par analyse de Fourier des images de RICM formées avec la lampe mercure. Les ajustements linéaires donnent les exposants suivants : -1.3 si $-7.4 < \ln q < -6.7$, -2.2 si $-6.7 < \ln q < -5.9$ et -3.6 si $-5.5 < \ln q < -5$.

observer et on obtient typiquement un comportement presque linéaire avec une pente proche de -2 sur toute la gamme de vecteurs d'onde sondés.

Spectre de fluctuations actif

La technique statistique avec la lampe mercure n'a permis de mettre en évidence aucune différence significative entre les spectres de fluctuations des vésicules purement lipidiques et ceux des vésicules contenant de la BR (voir Fig. D.10). La forme typique de la courbe représentant $\ln h^2$ en fonction de $\ln q$ est la même pour les deux populations de vésicules et les variations des exposants des lois de puissance d'une population à l'autre restent dans les barres d'erreur établies ci-dessus pour les spectres passifs.

Les résultats des expériences effectuées sur la même vésicule avec le laser rouge sont donnés sur la figure D.11. Les vésicules d'intensités de fluorescence I_F élevées ont été choisies. Aucun changement significatif du spectre de fluctuations n'a pu être détecté lorsque la lumière jaune est ajoutée.

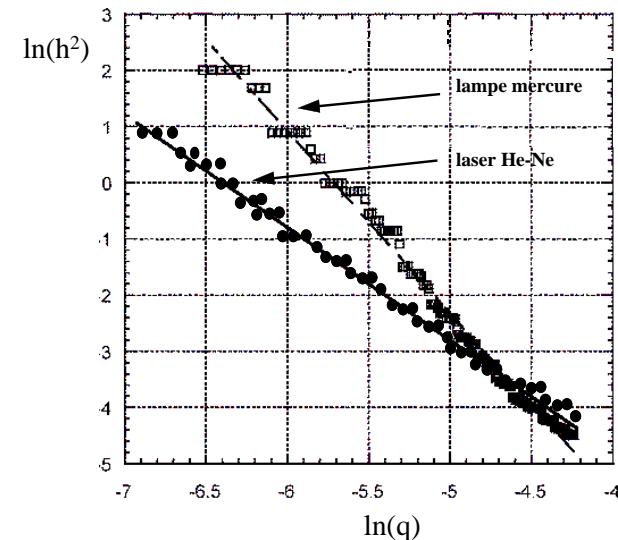


FIG. D.9: Comparaison des spectres de fluctuations de la même vésicule purement lipidique obtenus avec la lampe mercure ou le laser He-Ne.

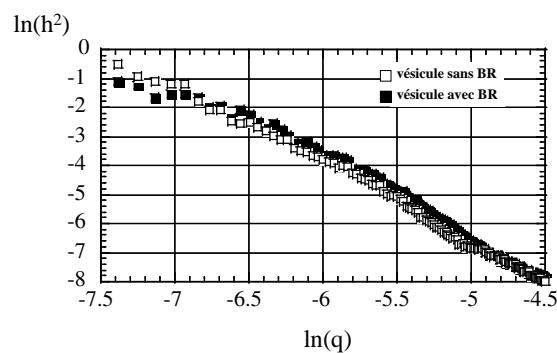


FIG. D.10: Comparaison des spectres de fluctuations obtenus avec la lampe mercure pour une vésicule purement lipidique et pour une vésicule contenant de la BR.

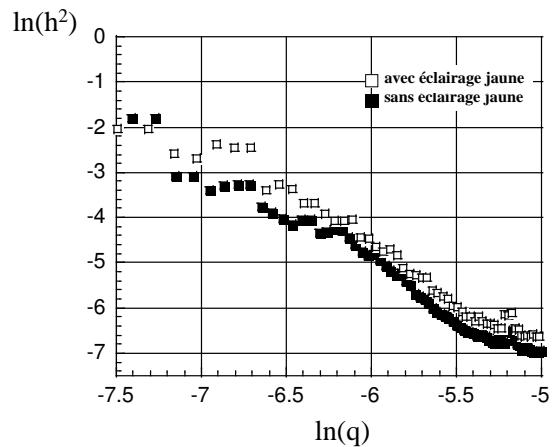


FIG. D.11: Comparaison des spectres de fluctuations obtenus avec le laser He-Ne pour une même vésicule contenant de la BR sans ou avec l'éclairage jaune en transmission.

D.3 Interprétation et discussion

D.3.1 Spectre de fluctuations passif

Avec la lampe mercure, les données fournies par le programme de transformation de Fourier reproduisent les résultats antérieurs [Rädler et al., 1995b]. On retrouve bien les différents régimes prévus par l'équation D.6 par ajustements linéaires des différentes pentes des courbes représentant $\ln\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$ en fonction de $\ln q_-$: une dépendance plus faible à petit q puis une décroissance en loi de puissance avec un exposant compris entre 2 et 4.

Les valeurs de la tension σ obtenues par ajustement des courbes en imposant les exposants sont de l'ordre de grandeur de la tension d'une vésicule fluctuant près d'une paroi : $\sigma \simeq 10^{-6} - 10^{-5}$ N/m. Les valeurs du paramètre V'' , représentant la courbure au minimum du potentiel d'interaction entre la membrane et la lamelle, sont plus dispersées car le nombre de points expérimentaux diminue aux petits vecteurs d'onde. V'' est de l'ordre de 10^7 J/m⁴ [Rädler et al., 1995b]. On peut confirmer cet ordre de grandeur en extrapolant les données à $q_- = 0$. A l'aide de l'équation D.6, on trouve : $V'' = kT/A\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle$ si $q_- = 0$. Avec une sélection de taille typique $A = 100(\mu\text{m})^2$ et des fluctuations de hauteur de l'ordre de $\langle h(\mathbf{q}_-)^2 \rangle \simeq 1 \text{ nm}^2$, on obtient : $V'' \simeq 4 \times 10^7 \text{ J/m}^4$ ce qui est bien du même ordre de grandeur que les valeurs de V'' obtenues par les ajustements. Il est difficile de comparer cette valeur à une valeur théorique

car on connaît mal les importances relatives des différentes interactions entre la membrane et la lamelle. Si on néglige les forces électrostatiques, V'' est uniquement déterminé par les forces de van der Waals et la force entropique de Helfrich [Rädler et al., 1995b]. Le calcul donne :

$$V'' \simeq \frac{A_H}{2\pi} \frac{1}{\langle h \rangle^4},$$

où $A_H \simeq kT$ est la constante de Hamaker et $\langle h \rangle \simeq 30 \text{ nm}$ est la distance de séparation moyenne entre la membrane et la lamelle. On en déduit : $V'' \simeq 8 \times 10^8 \text{ J/m}^4$, soit une valeur légèrement plus élevée que celle trouvée expérimentalement.

Les résultats obtenus avec la lampe mercure sur des vésicules purement lipidiques permettent aussi d'estimer les vecteurs d'onde de coupure entre les différents régimes prévus par l'équation D.6. A l'aide des valeurs typiques de $V'' \simeq 10^7 \text{ J/m}^4$ et de $\sigma \simeq 10^{-5} \text{ N/m}$ trouvées par les ajustements précédents, et avec $\kappa = 10kT$, on estime les deux vecteurs d'onde de coupure $\sqrt{V''/\sigma} \simeq 10^6 \text{ m}^{-1}$ et $\sqrt{\sigma/\kappa} \simeq 1.5 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$. Ces valeurs sont en assez bon accord avec les valeurs des vecteurs d'onde trouvées expérimentalement (voir §D.2.2). Selon les vésicules, les différents régimes sont plus ou moins facilement observables. Par exemple, pour les vésicules les plus tendues, seul le régime en $1/q_-^2$ se distingue clairement.

Les expériences sur les vésicules purement lipidiques avec le laser He-Ne ne permettent pas d'obtenir des renseignements quantitatifs pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le rapport signal/bruit est beaucoup plus faible qu'avec la lampe mercure et les données sont bruitées. Sur la même vésicule, nous avons remarqué que plus le signal est faible, plus les exposants du spectre de fluctuations diminuent (voir Fig. D.9). De plus, lorsque les images capturées sont peu contrastées, le gain automatique de la caméra CCD joue son rôle en laissant l'obturateur ouvert plus longtemps : la caméra augmente automatiquement son temps de pose, jusqu'à 1/50 s. Les modes sont donc moyennés sur un temps plus long lorsque le rapport signal/bruit est faible et le poids des modes lents augmente. Ces modes lents sont les modes de petits vecteurs d'onde (voir Eq. I.1.34, p. 27) : le poids des modes lents en q_-^2 est donc plus important que celui des modes rapides en q_-^4 et on s'attend à ce que l'exposant des lois de puissance mesuré diminue et tends vers 2.

D.3.2 Spectre de fluctuations actif

Les expériences statistiques avec la lampe mercure sont difficilement utilisables. Malgré les précautions prises, l'épaisseur de la couche de BSA n'est pas bien contrôlée. Les interactions électrostatiques entre la BSA et la bicouche peuvent être plus fortes dans le cas des vésicules contenant de la BR puisque la membrane est alors plus fortement chargée. Les différences entre les deux populations de vésicules pourraient être attribuées à l'épaisseur de la couche de BSA ou aux interactions électrostatiques répulsives et ne permettent pas de conclure quant à un éventuel rôle de la pression hors équilibre. Si l'épaisseur de BSA est plus importante, les franges sont moins contrastées et le signal dû aux fluctuations diminue : on s'attend alors à une diminution des exposants mesurés si l'épaisseur de BSA augmente. Il semble donc très difficile de comparer directement les spectres de fluctuations obtenus avec les deux populations de vésicules.

Les expériences effectuées sur la même vésicule avec le laser rouge devraient en principe régler ce problème et permettre une comparaison qualitative directe, bien qu'aucune information quantitative ne puisse être déduite de ces expériences. Il faut être sûr cependant de comparer les mêmes modes de fluctuations dans le cas où la membrane est passive et dans celui où elle est active. Le temps d'intégration et la vitesse d'obturation de la caméra doivent être identiques dans les deux cas. Or, ici, la lumière jaune utilisée pour activer la BR n'est pas complètement filtrée et diminue le contraste des franges d'interférence, donc le rapport signal/bruit. L'effet du gain automatique de la caméra pose là encore problème pour l'interprétation des résultats.

D.3.3 Problèmes expérimentaux à résoudre

Nous n'avons donc pas pu mettre pour le moment en évidence d'effet spectaculaire de l'activité de la BR dans le cas de vésicules fluculant à proximité d'une paroi. Un certain nombre de problèmes expérimentaux restent à résoudre pour optimiser les conditions des expériences.

Nous devons éliminer toute interaction répulsive parasite entre la membrane et le verre pour pouvoir n'étudier que la force répulsive due aux fluctuations. Les interactions électrostatiques sont les plus difficiles à éviter. Les problèmes d'adhésion électrostatique des vésicules sur la lame de verre traitée au MgF₂ n'ont pas été résolus. L'adsorption de BSA permet d'éviter l'adhésion forte des vésicules sur la lame mais l'épaisseur de la couche de BSA n'est pas contrôlée et sa répartition n'est peut-être pas homogène, ce qui rend toute interprétation quantitative des spectres obtenus très délicate. Nous cherchons maintenant à remplacer le MgF₂ en déposant directement sur le verre nu un polymère neutre d'indice comparable à celui du MgF₂ (n_{polym} = 1.37 – 1.4) et formant un film stable dans l'eau. Les premiers essais avec le polybutylacrylate se sont révélés infructueux : le polymère démolit lorsque la solution de vésicules est ajoutée. Il semble très difficile de trouver un polymère ayant toutes les propriétés désirées. Nous essayons aussi de déposer sur le MgF₂ une couche très fine d'épaisseur contrôlée par '*spin-coating*' de polymères neutres.

Pour pouvoir réaliser l'expérience de RICM avec et sans activation de la BR sur la même vésicule, il faut être capable de former les franges d'interférence en lumière rouge, d'ajouter l'éclairage jaune puis de le filtrer pour ne conserver que les franges d'interférence. Nous n'avons pour le moment pas trouvé de technique pour former des franges d'interférence en lumière rouge d'intensité suffisante pour que les fluctuations de la vésicule puisse sortir du bruit de manière significative. Malgré les difficultés liées au *speckle* et la présence de franges parasites lorsque l'on utilise un laser, la seule solution envisageable en lumière rouge passe par l'utilisation d'un laser He-Ne plus puissant (200 – 500 mW) ou de la raie à 640 nm d'un laser krypton-argon (300 mW).

On pourrait aussi envisager d'éclairer la BR avec d'autres longueurs d'onde qui n'excitent pas le pompage de protons. Nous avons essayé le proche infra-rouge, à l'aide d'une diode électroluminescente de 30 mW à 770 nm (HE 7601 SG, Hitachi). La puissance maximale de ces diodes ne permet pas d'obtenir des images de bonne qualité. On peut aussi tenter d'éclairer la BR en

bleu, par exemple à l'aide des raies à 405 nm ou à 436 nm de la lampe mercure. Nous avons évité cette solution jusqu'à présent à cause de l'existence du cycle secondaire de la BR, excité à 410 nm. Ce cycle secondaire met en jeu des changements de conformation actifs de la BR mais ne conduit pas à un pompage net de protons. L'interprétation serait alors plus compliquée.

Comme dans toute technique d'analyse spectrale, le spectre de fluctuations obtenu à partir des images de RICM dépend des modes sondés par cette technique. L'étendue du domaine de vecteurs d'onde est limitée par la taille du pixel et par la taille finie des sélections sur lesquelles les transformations de Fourier sont effectuées. La résolution temporelle est elle aussi limitée et les modes rapides sont moyennés pendant le temps d'obturation de la caméra. Les facteurs correctifs dûs au temps d'intégration de la caméra ont été calculés pour l'analyse de contours quasi-sphériques [Faucon et al., 1989, Méléard et al., 1992] mais pas pour l'analyse des images de RICM. Pourtant, connaître ces corrections à apporter à l'amplitude des fluctuations semble être indispensable pour envisager une interprétation quantitative des expériences de RICM. De plus, les problèmes que nous avons rencontrés liés au gain automatique de la caméra, peuvent être résolus si la caméra est suffisamment sensible pour pouvoir traiter le maximum de modes possibles, et si elle peut être utilisée en gain manuel pour pouvoir traiter toujours le même nombre de modes.

Annexe E

Traitement d'images par transformée de Fourier rapide

Le listing du programme n'est pas inclus ici, mais est disponible sur le site Web du laboratoire (<http://www.curie.fr>). Le programme a été écrit en C++. Le programme lui-même est utilisé sous DOS alors que les fenêtres utilisées par la carte d'acquisition (Meteor, Matrox) pour afficher les images sont gérées par Windows NT. Cela pose parfois quelques problèmes et nous avons commencé à adapter le programme en VisualC++. Le programme se sert de la bibliothèque de routines MIL-Lite (Matrox) pour faire dialoguer la carte d'acquisition et l'ordinateur. Nous décrivons brièvement l'architecture du programme ci-dessous.

A partir des images indiquées par la variable `itera` variant de 1 à `Frames`, la carte lit les intensités en niveau de gris et les stocke dans un tableau tridimensionnel `image(itera,i,j)`, où `i` et `j` sont les coordonnées du pixel. La taille de la sélection est supérieure à celle dans laquelle la transformée de Fourier sera effectuée. L'utilisateur la détermine de façon à ce qu'elle inclue quelques franges d'interférence. En fonction de `Frames` et de la taille de la sélection, le programme met plus ou moins de temps pour acquérir chaque image. On vérifie bien que l'acquisition se fait bien en temps réel en comparant le nombre d'images traitées et le nombre d'images qui ont défilé.

Les intensités maximale et minimale des franges d'interférence sont déterminées pour chaque image et servent ensuite à déterminer les distances de séparation entre la membrane et la lamelle `hauteur(itera,i,j)` à l'aide de la formule d'inversion D.4 (p. 243). La routine de transformation de Fourier rapide bidimensionnelle a été adaptée de *Numerical Recipes in C* [Press et al., 1992] et donne pour résultat l'amplitude complexe de la transformée de Fourier stockée dans `fft(itera,i,j)`. Puis le spectre de fluctuations `sqamp1(i,j)` est calculé comme le module au carré de `fft(itera,i,j)` et moyenné sur toutes les images. Le test de Parseval est utilisé pour vérifier le calcul numérique de l'amplitude de la transformée de Fourier. Enfin, on convertit le spectre de fluctuations `sqamp1(i,j)` obtenu en fonction des coordonnées cartésiennes ($i \leftrightarrow q_x$ et $j \leftrightarrow q_y$) en spectre de fluctuations exprimé en fonction du module du vecteur d'onde q_- . La routine de conversion permet de moyenner les valeurs de `sqamp1(i,j)` pour un

module q_- donné. Le module est incrémenté de façon discrète et l'utilisateur peut régler le pas d'incrémentation (variable `NMAX`). Si l'incrément est trop petit, on obtient des points multivalués pour les petits vecteurs d'onde. Si au contraire le pas est trop grand, on perd de l'information au vecteurs d'onde plus élevés.

Les résultats sont stockés sur le disque, puis analysés à l'aide du logiciel Kaleidagraph. Les transformées de Fourier des images en niveau de gris `image(itera,i,j)` peuvent aussi être calculées par notre programme puis visualisées par le logiciel Scion Image. Nous avons ainsi pu les comparer aux transformées de Fourier obtenues directement par ce même logiciel pour vérifier que notre programme fonctionne bien.

Bibliographie

- [Akashi et al., 1996] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.*, 71 :3242–3250.
- [Akashi et al., 1998] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. (1998). Formation of giant liposomes promoted by divalent cations : critical role of electrostatic repulsion. *Biophys. J.*, 74 :2973–2982.
- [Alberts et al., 1994] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., 3 ème édition.
- [Anderson and Stevens, 1973] Anderson, C. and Stevens, C. (1973). Voltage-clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junctions. *J. Physiol.*, 235 :655–691.
- [Angelova and Dimitrov, 1987] Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. (1987). Swelling of charged lipids and formation of liposomes on electrode surfaces. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 152 :89.
- [Angelova et al., 1992] Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J. F., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89 :127–131.
- [Bacri et al., 1996] Bacri, J.-C., Cabuil, V., Cebers, A., Ménager, C., and Perzynski, R. (1996). Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field. *Europhys. Lett.*, 33 :235–240.
- [Baeriswyl, 1987] Baeriswyl, editor (1987). *Physics in Living Matter*. Academic Press, 2ème édition.
- [Bailly et al., 1991] Bailly, E., Celati, C., and Bornens, M. (1991). The cortical actomyosin system of cytochalasin d-treated lymphoblasts. *Exp. Cell. Res.*, 196 :287–293.
- [Bar-Ziv and Moses, 1994] Bar-Ziv, R. and Moses, E. (1994). Instability and 'pearling' states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Phys. Rev. Lett.*, 73 :1392–1395.
- [Bar-Ziv et al., 1997] Bar-Ziv, R., Tlusty, T., and Moses, E. (1997). Critical dynamics in the pearling instability of membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 79 :1158–1161.
- [Bassereau et al., 1987] Bassereau, P., Marignan, J., and Porte, G. (1987). An X-ray study of brine swollen lyotropic lamellar phases. *J. Phys.*, 48 :673–678.
- [Bensimon et al., 1990] Bensimon, D., David, F., Leibler, S., and Pumir, A. (1990). Stability of charged membranes. *J. Phys. France*, 51 :689–695.
- [Benyoussef et al., 1998] Benyoussef, A., Dohmi, D., Kenz, A. E., and Peliti, L. (1998). Phase diagram of randomly polymerized membrane. *Eur. Phys. J. B*, 6 :503–510.
- [Bernard, 1999] Bernard, A.-L. (1999). *Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation : perceuse moléculaire et autres exemples*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Bernardes, 1996] Bernardes, A. T. (1996). Monte carlo simulation of vesicle self-organisation. *J. Phys. II France*, 6 :169–174.
- [Berndl et al., 1990] Berndl, K., Käs, J., Lipowsky, R., Sackmann, E., and Seifert, U. (1990). Shape transformations of giant vesicles : extreme sensitivity to bilayer asymmetry. *Europhys. Lett.*, 13 :659–664.
- [Bezrukov et al., 1994] Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I., and Parsegian, V. A. (1994). Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature*, 370 :279–281.
- [Birge, 1990] Birge, R. R. (1990). Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1016 :293–327.
- [Bivas et al., 1987] Bivas, I., Hanusse, P., Bothorel, P., Lalanne, J., and Aguerre-Chariol, O. (1987). An application of the optical microscopy to the determination of the curvature elastic modulus of biological and model membranes. *J. Physique*, 48 :855–867.
- [Bloom et al., 1991] Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. G. (1991). Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes : a perspective. *Q. Rev. Biophys.*, 24 :293–397.
- [Bo and Waugh, 1989] Bo, L. and Waugh, R. E. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, 55 :509–517.
- [Boal, 1994] Boal, D. H. (1994). Computer simulation of a model network for the erythrocyte cytoskeleton. *Biophys. J.*, 67 :521–529.
- [Bongrand et al., 1994] Bongrand, P., Claesson, P. M., and Curtis, A. S. G., editors (1994). *Studying cell adhesion*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [Boroske et al., 1981] Boroske, E., Elwenspoek, M., and Helfrich, W. (1981). Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys. J.*, 34 :95–109.
- [Brochard and de Gennes, 1975] Brochard, F. and de Gennes, P.-G. (1975). Hydrodynamic properties of fluid lamellar phases of lipid/water. *Pramana, Suppl.*, 1 :1–21.
- [Brochard et al., 1976] Brochard, F., de Gennes, P.-G., and Pfeuty, P. (1976). Surface tension and deformations of membrane structures : relation to two-dimensional phase transitions. *J. Phys.*, 37 :1099–1104.
- [Brochard and Lennon, 1975] Brochard, F. and Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Phys.*, 36 :1035–1047.

- [Bruinsma, 1996] Bruinsma, R. (1996). Rheology of shape transitions of vesicles under capillary flow. *Physica A*, 234 :249–270.
- [Bukman et al., 1996] Bukman, D. J., Yao, J. H., and Wortis, M. (1996). Stability of cylindrical vesicles under axial tension. *Phys. Rev. E*, 54 :5463–5468.
- [Cai and Lubensky, 1994] Cai, W. and Lubensky, T. C. (1994). Covariant hydrodynamics of fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 73 :1186–1189.
- [Cai and Lubensky, 1995] Cai, W. and Lubensky, T. C. (1995). Hydrodynamics and dynamic fluctuations of fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 52 :4251–4266.
- [Canham, 1970] Canham, P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 26 :61–81.
- [Cantor, 1997] Cantor, R. S. (1997). Lateral pressures in cell membranes : a mechanism for modulation of protein function. *J. Phys. Chem. B*, 101 :1723–1725.
- [Cevel and Marsh, 1987] Cevel, G. and Marsh, D. (1987). *Phospholipid bilayers : physical principles and models*. John Wiley and Sons.
- [Charitat et al., 1999] Charitat, T., Bellet-Amalric, E., Fragneto, G., and Graner, F. (1999). Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *Eur. Phys. J. B*, 8 :583–593.
- [Charitat and Fourcade, 1997] Charitat, T. and Fourcade, B. (1997). Lattice of passages connecting membranes. *J. Phys. II France*, 7 :15–35.
- [Chen et al., 1997] Chen, C.-M., Higgs, P. G., and MacKintosh, F. C. (1997). Theory of fission for two-component lipid vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 79 :1579–1582.
- [Cherry et al., 1978] Cherry, R. J., Müller, U., Henderson, R., and Heyn, M. P. (1978). Temperature-dependant aggregation of bacteriorhodopsin in dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.*, 121 :283–298.
- [Cherry et al., 1980] Cherry, R. J., Müller, U., Holenstein, C., and Heyn, M. P. (1980). Lateral segregation of proteins induced by cholesterol in bacteriorhodopsin-phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 596 :145–151.
- [Chou et al., 1997] Chou, T., Jaric, V., and Siggia, E. D. (1997). Electrostatics of lipid bilayer bending. *Biophys. J.*, 72 :2042–2055.
- [Crawford and Earnshaw, 1987] Crawford, G. E. and Earnshaw, J. C. (1987). Viscoelastic relaxation of bilayer lipid membranes. *Biophys. J.*, 52 :87–94.
- [Crilly and Earnshaw, 1983] Crilly, J. F. and Earnshaw, J. C. (1983). Photon correlation spectroscopy of bilayer lipid membranes. *Biophys. J.*, 41 :197–210.
- [Curtis, 1964] Curtis, A. S. G. (1964). The mechanism of adhesion of cells to glass - a study by interference reflection microscopy. *J. Cell. Biol.*, 20 :199–215.
- [Damodaran and Merz, 1994] Damodaran, K. V. and Merz, K. M. (1994). A comparison between DMPC- and DLPE-based lipid bilayers. *Biophys. J.*, 66 :1076–1087.

- [David and Leibler, 1991] David, F. and Leibler, S. (1991). Vanishing tension of fluctuating membranes. *J. Phys. II France*, 1 :959–976.
- [de Gennes, 1979] de Gennes, P.-G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell University Press, Ithaca and London.
- [de Gennes and Papoular, 1969] de Gennes, P.-G. and Papoular, M. (1969). *Vibrations de basse fréquence dans certaines structures biologiques* in 'Volume jubilaire en l'honneur de A. Kastler'. P. U. F. Paris.
- [de Gennes and Taupin, 1982] de Gennes, P.-G. and Taupin, C. (1982). Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *J. Phys. Chem.*, 86 :2294–2304.
- [de Haas et al., 1997] de Haas, K. H., Blom, C., van den Ende, D., Duits, M. H. G., and Mellema, J. (1997). Deformation of giant lipid bilayer vesicles in shear flow. *Phys. Rev. E*, 56 :7132–7137.
- [Deuling and Helfrich, 1976] Deuling, H. J. and Helfrich, W. (1976). The curvature elasticity of fluid membranes : a catalogue of vesicle shapes. *J. Physique*, 37 :1335–1345.
- [Dietrich et al., 1997] Dietrich, C., Angelova, M., and Pouliquen, B. (1997). Adhesion of latex spheres to giant phospholipid vesicles : statics and dynamics. *J. Phys. II France*, 7 :1651–1682.
- [Döbereiner et al., 1997a] Döbereiner, H.-G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. (1997a). Mapping vesicle shapes into the phase diagram : a comparison a comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 55 :4458–4474.
- [Döbereiner et al., 1993] Döbereiner, H.-G., Käs, J., Noppl, D., Sprenger, I., and Sackmann, E. (1993). Budding and fission of vesicles. *Biophys. J.*, 65 :1396–1403.
- [Döbereiner et al., 1997b] Döbereiner, H.-G., Lehmann, A., Goedel, W., Selchow, O., and Lipowsky, R. (1997b). Membrane curvature induced by sugar and polymer solutions. MRS Meeting, symposium 'Material science of the cell'.
- [Döbereiner and Seifert, 1996] Döbereiner, H.-G. and Seifert, U. (1996). Giant vesicles at the prolate-oblate transition : a macroscopic bistable system. *Europhys. Lett.*, 36 :325–330.
- [Döbereiner et al., 1999] Döbereiner, H.-G., Selchow, O., and Lipowsky, R. (1999). Spontaneous curvature of asymmetric bilayer membranes. preprint.
- [Dommersnes et al., 1998] Dommersnes, P. G., Fournier, J. B., and Galatola, P. (1998). Long-range elastic forces between membrane inclusions in spherical vesicles. *Europhys. Lett.*, 42 :233–238.
- [Dörries and Foltin, 1996] Dörries, G. and Foltin, G. (1996). Energy dissipation of fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 53 :2547–2550.
- [Drovetzky et al., 1998] Drovetzky, B. Y., Chu, J. C., and Mak, C. H. (1998). Computer simulations of self-avoiding polymerized membranes. *J. Chem. Phys.*, 108 :6554–6557.
- [Drury and Dembo, 1999] Drury, J. L. and Dembo, M. (1999). Hydrodynamics of micropipette aspiration. *Biophys. J.*, 76 :110–128.

- [Dumas et al., 1997] Dumas, F., Sperotto, M. M., Lebrun, M.-C., Tocanne, J.-F., and Mouritsen, O. G. (1997). Molecular sorting of lipids by bacteriorhodopsin in dilauroylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine lipid bilayers. *Biophys. J.*, 73 :1940–1953.
- [Duplantier et al., 1990] Duplantier, B., Goldstein, R. E., Romero-Rochin, V., and Pesci, A. I. (1990). Geometrical and topological aspects of electric double layers near curved surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 65 :508–511.
- [Durliat, 1997] Durliat, G. (1997). *Biochimie structurale*. Diderot éditeur, arts et science.
- [Duwe et al., 1989] Duwe, H.-P., Eggli, P., and Sackmann, E. (1989). The cell-plasma membrane as composite system of two-dimensional liquid crystal and macromolecular network and how to mimick its physical properties. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 166 :1–19.
- [Duwe et al., 1990] Duwe, H. P., Käs, J., and Sackmann, E. (1990). Bending elastic moduli of lipid bilayers : modulation by solutes. *J. Phys. France*, 51 :945–962.
- [Ebrey, 1993] Ebrey, T. G. (1993). *Light energy transduction in bacteriorhodopsin*. CRC Press Inc.
- [Elbaum et al., 1996] Elbaum, M., Fygenson, D. K., and Libchaber, A. (1996). Buckling microtubules in vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 76 :4078–4081.
- [Elgsaeter et al., 1986] Elgsaeter, A., Stokke, B. T., Mikkelsen, A., and Branton, D. (1986). The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234 :1217–1223.
- [Emsellem et al., 1998] Emsellem, V., Cardoso, O., and Tabeling, P. (1998). Vesicle deformation by microtubules : a phase diagram. *Phys. Rev. E*, 58 :4807–4810.
- [Engelhardt et al., 1985] Engelhardt, H., Duwe, H. P., and Sackmann, E. (1985). Bilayer bending elasticity measured by fourier analysis of thermally excited surface undulations of flaccid vesicles. *J. Phys. Lett.*, 46 :L395–L400.
- [Engelhardt and Sackmann, 1988] Engelhardt, H. and Sackmann, E. (1988). On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields. *Biophys. J.*, 54 :495–508.
- [Evans, 1991] Evans, E. (1991). Entropy-driven tension in vesicle membranes and unbinding of adherent vesicles. *Langmuir*, 7 :1900–1908.
- [Evans and Needham, 1986] Evans, E. and Needham, D. (1986). Giant vesicle bilayers composed of mixtures of lipids, cholesterol and polypeptides. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81 :267–280.
- [Evans and Needham, 1987] Evans, E. and Needham, D. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.*, 91 :4219–4228.
- [Evans and Rawicz, 1990] Evans, E. and Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 64 :2094–2097.
- [Evans and Rawicz, 1997] Evans, E. and Rawicz, W. (1997). Elasticity of ‘fuzzy’ biomembranes. *Phys. Rev. Lett.*, 79 :2379–2382.

- [Evans, 1973] Evans, E. A. (1973). A new material concept for the red cell membrane. *Biophys. J.*, 13 :926–940.
- [Evans, 1974] Evans, E. A. (1974). Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys. J.*, 14 :923–931.
- [Evans, 1980] Evans, E. A. (1980). Analysis of adhesion of large vesicles to surfaces. *Biophys. J.*, 31 :425–431.
- [Evans, 1983] Evans, E. A. (1983). Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. *Biophys. J.*, 43 :27–30.
- [Evans and Parsegian, 1986] Evans, E. A. and Parsegian, V. A. (1986). Thermal-mechanical fluctuations enhance repulsion between bimolecular layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :7132–7136.
- [Evans et al., 1976] Evans, E. A., Waugh, R., and Melnik, L. (1976). Elastic area compressibility modulus of red blood cell membrane. *Biophys. J.*, 16 :585–595.
- [Fan, 1973] Fan, C. (1973). Fluctuations and light scattering from anisotropic interfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, 44 :369–381.
- [Farge and Devaux, 1992] Farge, E. and Devaux, P. F. (1992). Shape changes of giant liposomes induced by asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.*, 61 :347–357.
- [Fattal and Ben-Shaul, 1993] Fattal, D. R. and Ben-Shaul, A. (1993). A molecular model for lipid-protein interaction in membranes : the role of hydrophobic mismatch. *Biophys. J.*, 65 :1795–1809.
- [Fattal and Ben-Shaul, 1994] Fattal, D. R. and Ben-Shaul, A. (1994). Mean-field calculations of chain packing and conformational statistics in lipid bilayers : comparison with experiments and molecular dynamics studies. *Biophys. J.*, 67 :983–995.
- [Faucon et al., 1989] Faucon, J. F., Mitov, M. D., Méléard, P., Bivas, I., and Bothorel, P. (1989). Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, 50 :2389–2414.
- [Finkelstein, 1984] Finkelstein, A. (1984). *Current topics in membrane and transport*, volume 21. Academic Press, New York, NY.
- [Fisher and Fisher, 1982] Fisher, M. E. and Fisher, D. S. (1982). Wall wandering and the dimensionality dependance of the commensurate-incommensurate transition. *Phys. Rev. B*, 25 :3192–3198.
- [Fürster, 1986] Fürster, D. (1986). On the scale dependance, due to thermal fluctuations, of the elastic properties of membranes. *Physics Letters A*, 114 :115–120.
- [Fournier, 1996] Fournier, J. B. (1996). Nontopological saddle-splay and curvature instabilities from anisotropic membrane inclusions. *Phys. Rev. Lett.*, 76 :4436–4439.
- [Fygenson et al., 1997a] Fygenson, D. K., Elbaum, M., Shraiman, B., and Libchaber, A. (1997a). Microtubules and vesicles under controlled tension. *Phys. Rev. E*, 55 :850–859.

- [Fygenson et al., 1997b] Fygenson, D. K., Marko, J. F., and Libchaber, A. (1997b). Mechanics of microtubule-based membrane extension. *Phys. Rev. Lett.*, 79 :4497–4500.
- [Gebhardt et al., 1977] Gebhardt, C., Gruler, H., and Sackmann, E. (1977). On domain structure and local curvature in lipid bilayers and biological membranes. *Z. Naturforsch. Teil C*, 32 :581–596.
- [Gelbart and Bruinsma, 1997] Gelbart, W. M. and Bruinsma, R. (1997). Compositional-mechanical instability of interacting mixed lipid membranes. *Phys. Rev. E*, 55 :831–835.
- [Gerbeaud, 1998] Gerbeaud, C. (1998). *Effet de l'insertion de protéines et de peptides membranaires sur les propriétés mécaniques et les changements morphologiques de vésicules géantes*. PhD thesis, Université Bordeaux I.
- [Gerschel, 1995] Gerschel, A. (1995). *Liaisons intermoléculaires*. CNRS éditions.
- [Gingell and Todd, 1979] Gingell, D. and Todd, I. (1979). Interference reflexion microscopy - a quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurements. *Biophys. J.*, 26 :507–526.
- [Goldstein et al., 1996] Goldstein, R. E., Nelson, P., Powers, T., and Seifert, U. (1996). Front propagation in the pearlning instability of tubular vesicles. *J. Phys. II France*, 6 :767–796.
- [Goldstein et al., 1990] Goldstein, R. E., Pesci, A. I., and Romero-Rochin, V. (1990). Electric double layers near modulated surfaces. *Phys. Rev. A*, 41 :5504–5515.
- [Golubovic and Golubovic, 1997] Golubovic, L. and Golubovic, M. (1997). Nonequilibrium size distributions of fluid membrane vesicles. *Phys. Rev. E*, 56 :3219–3230.
- [Gompper and Kroll, 1989] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1989). Steric interactions in multi-membrane systems : a Monte Carlo study. *Europhys. Lett.*, 9 :59–64.
- [Gompper and Kroll, 1995] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1995). Phase diagram and scaling behavior of fluid vesicles. *Phys. Rev. E*, 51 :514–525.
- [Gompper and Kroll, 1996] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1996). Random surface discretizations ans the renormalization of the bending rigidity. *J. Phys. I France*, 6 :1305–1320.
- [Gompper and Kroll, 1997a] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1997a). Freezing flexible vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 78 :2859–2862.
- [Gompper and Kroll, 1997b] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1997b). The freezing of flexible vesicles of spherical topology. *J. Phys I France*, 7 :1369–1390.
- [Goulian et al., 1993] Goulian, M., Bruinsma, R., and Pincus, P. (1993). Long-range forces in heterogeneous fluid membranes. *Europhys. Lett.*, 22 :145–150.
- [Goulian et al., 1998] Goulian, M., Mesquita, O. N., Fygenson, D. K., Nielsen, C., Andersen, O. S., and Libchaber, A. (1998). Gramicidin channel kinetics under tension. *Biophys. J.*, 74 :328–337.
- [Grabowski and Cowen, 1977] Grabowski, E. F. and Cowen, J. A. (1977). Thermal excitations of a bilipid membrane. *Biophys. J.*, 18 :23–28.

- [Gulik-Krzywicki, 1987] Gulik-Krzywicki, T. (1987). Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.*, 262 :15580–15588.
- [Häckl et al., 1998] Häckl, W., Bärman, M., and Sackmann, E. (1998). Shape changes of self-assembled actin bilayer composite membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :1786–1789.
- [Häckl et al., 1997] Häckl, W., Seifert, U., and Sackmann, E. (1997). Effects of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependance of the effective tension of giant vesicles. *J. Phys. II France*, 7 :1141–1157.
- [Haibel et al., 1998] Haibel, A., Nimtz, G., Pelster, R., and Jaggi, R. (1998). Translational diffusion in phospholipid bilayer membranes. *Phys. Rev. E*, 57 :4838–4841.
- [Hansen et al., 1998] Hansen, P. L., Miao, L., and Ipsen, J. H. (1998). Fluid lipid bilayers : intermonolayer coupling and its thermodynamic manifestations. *Phys. Rev. E*, 58 :2311–2324.
- [Harbich and Helfrich, 1990] Harbich, W. and Helfrich, W. (1990). Adhesion in egg lecithin multilayer systems produced by cooling. *J. Phys. France*, 51 :1027–1048.
- [Harden and MacKintosh, 1994] Harden, J. L. and MacKintosh, F. C. (1994). Shape transformations of domains in mixed-fluid films and bilayer membranes. *Europhys. Lett.*, 28 :495–500.
- [Hashimoto et al., 1998] Hashimoto, S., Sasaki, H., and Takeuchi, H. (1998). Ultraviolet resonance raman evidence for the opening of a water-permeable channel in the M to N transition of bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 :443–444.
- [Heberle and Dencher, 1992] Heberle, J. and Dencher, N. A. (1992). Surface-bound optical probes monitor proton translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89 :5996–6000.
- [Heberle et al., 1994] Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., Oesterhelt, D., and Dencher, N. A. (1994). Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature*, 370 :379–382.
- [Heinrich et al., 1997] Heinrich, V., Sevsek, F., Svetina, S., and Zeks, B. (1997). Large deviations of the average shapes of vesicles from equilibrium : effects of thermal fluctuations in the presence of constraints. *Phys. Rev. E*, 55 :1809–1818.
- [Heinrich et al., 1993] Heinrich, V., Svetina, S., and Zeks, B. (1993). Nonaxisymmetric vesicle shapes in a generalized bilayer-couple model and the transition between oblate and prolate axisymmetric shapes. *Phys. Rev. E*, 48 :3112–3123.
- [Helfrich, 1973] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. Teil C*, 28 :693–703.
- [Helfrich, 1978] Helfrich, W. (1978). Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Z. Naturforsch. Teil A*, 33 :305–315.
- [Helfrich, 1985] Helfrich, W. (1985). Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces. *J. Physique*, 46 :1263–1268.
- [Helfrich, 1989] Helfrich, W. (1989). Hats and saddles in liquid membranes. *Liquid Crystals*, 5 :1647–1658.

- [Helfrich, 1998] Helfrich, W. (1998). Stiffening of fluid membranes and entropy loss of membrane closure : two effects of thermal undulations. *Eur. Phys. J. B*, 1 :481–489.
- [Helfrich and Kozlov, 1994] Helfrich, W. and Kozlov, M. K. (1994). Flexibility and roughness of mixed and partially polymerized bilayers in terms of the hat model and local bending frustration. *J. Phys. II France*, 4 :1427–1438.
- [Helfrich and Servuss, 1984] Helfrich, W. and Servuss, R.-M. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento (D)*, 3 :137–151.
- [Hellal et al., 1999] Hellal, K., Biben, T., and Hansen, J.-P. (1999). Influence of capillary confinement on the equilibrium shape of vesicles. *J. Phys. : Condens. Matter*, 11 :L58–L51.
- [Hellingwerf et al., 1979] Hellingwerf, K. J., Arents, J. C., Scholte, B. J., and Westerhoff, H. V. (1979). Bacteriorhodopsin in liposomes. ii. Experimental evidence in support of a theoretical model. *Biochim. Biophys. Acta*, 547 :561–582.
- [Henderson and Unwin, 1975] Henderson, R. and Unwin, P. N. T. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257 :28–32.
- [Hénon et al., 1999] Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F. (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.*, 76 :1145–1151.
- [Heyn et al., 1981] Heyn, M. P., Cherry, R. J., and Dencher, N. A. (1981). Lipid-protein interactions in bacteriorhodopsin-dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 20 :840–848.
- [Hiergeist et al., 1996] Hiergeist, C., Indrani, V. A., and Lipowsky, R. (1996). Membranes with anchored polymers at the adsorption transition. *Europhys. Lett.*, 36 :491–496.
- [Hiergeist and Lipowsky, 1996] Hiergeist, C. and Lipowsky, R. (1996). Elastic properties of polymer-decorated membranes. *J. Phys. II France*, 6 :1465–1481.
- [Hirn et al., 1999] Hirn, R., Benz, R., and Bayerl, T. M. (1999). Collective membrane motions in the mesoscopic range and their modulation by the binding of a mono-molecular protein layer of streptavidin studied by dynamic light scattering. submitted to Phys. Rev. E.
- [Hochmuth et al., 1973] Hochmuth, R. M., Mohandas, N., and Blackshear, P. L. (1973). Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.*, 13 :747–762.
- [Hotani and Miyamoto, 1990] Hotani, H. and Miyamoto, H. (1990). Dynamic features of microtubules as visualized by dark-field microscopy. *Adv. Biophys.*, 26 :135–156.
- [Hotz and Meier, 1998] Hotz, J. and Meier, W. (1998). Vesicle-templated polymer hollow spheres. *Langmuir*, 14 :1031–1036.
- [Huang, 1986] Huang, W. H. (1986). Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime. *Biophys. J.*, 50 :1061–1070.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, 2ème édition.

- [Jacobson and Dietrich, 1999] Jacobson, K. and Dietrich, C. (1999). Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biology*, 9 :87–91.
- [Jacobson et al., 1995] Jacobson, K., Sheets, E. D., and Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268 :1441–1442.
- [Janke and Kleinert, 1987] Janke, W. and Kleinert, H. (1987). Fluctuation pressure of a stack of membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 58 :144–147.
- [Jansen, 1994] Jansen, M. (1994). *Intersuchung der Wasserpermeation durch Lipidmembranen*. PhD thesis, Universität Keiserslautern.
- [Jaric et al., 1995] Jaric, M., Seifert, U., Wintz, W., and Wortis, M. (1995). Vesicular instabilities : the prolate-to-oblate transition and other shape instabilities of fluid bilayer membranes. *Phys. Rev. E*, 52 :6623–6634.
- [Jie et al., 1998] Jie, Y., Quanhui, L., Jixing, L., and Zhong-Can, O.-Y. (1998). Numerical observation of nonaxisymmetric vesicles in fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 58 :4730–4736.
- [Jülicher, 1996] Jülicher, F. (1996). The morphology of vesicles of higher topological genus : conformal degeneracy and conformal modes. *J. Phys. II France*, 6 :1797–1824.
- [Jülicher and Lipowsky, 1993] Jülicher, F. and Lipowsky, R. (1993). Domain-induced budding of vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 70 :2964–2967.
- [Jülicher and Lipowsky, 1996] Jülicher, F. and Lipowsky, R. (1996). Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E*, 53 :2670–2683.
- [Jülicher et al., 1993] Jülicher, F., Seifert, U., and Lipowsky, R. (1993). Conformal degeneracy and conformal diffusion of vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 71 :452–455.
- [Jung et al., 1997] Jung, M., Hubert, D. H. W., Bomans, P. H. H., Frederik, P. M., Meuldijk, J., van Herk, A. M., Fischer, H., and German, A. L. (1997). New vesicle-polymer hybrids : the parachute architecture. *Langmuir*, 13 :6877–6880.
- [Kandori et al., 1998] Kandori, H., Kinoshita, N., Shichida, Y., and Maeda, A. (1998). Protein structural changes in bacteriorhodopsin upon photoisomerization as revealed by polarized fir spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 102 :7899–7905.
- [Kardar and Nelson, 1987] Kardar, M. and Nelson, D. R. (1987). Epsilon expansion for crumpled manifolds. *Phys. Rev. Lett.*, 58 :1289–1292.
- [Kats et al., 1996] Kats, E. I., Lebedev, V. V., and Muratov, A. R. (1996). Nearly spherical vesicles : shape fluctuations. *JETP Lett.*, 63 :216–221.
- [Kern and Fourcade, 1997] Kern, N. and Fourcade, B. (1997). Vesicles decorated with magnetic particles. *Europhys. Lett.*, 38 :395–400.
- [Kim et al., 1998] Kim, K. S., Neu, J., and Oster, G. (1998). Curvature-mediated interactions between membrane proteins. *Biophys. J.*, 75 :2274–2291.
- [Kim et al., 1999] Kim, K. S., Neu, J. C., and Neu, G. F. (1999). Many-body forces between membrane inclusions : a new pattern-formation mechanism. submitted to Europhys. Lett.

- [Kimura et al., 1997] Kimura, Y., Vassylyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T., and Fujiyoshi, Y. (1997). Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature*, 389 :206–211.
- [Kohyama, 1998] Kohyama, T. (1998). Curvature instability in fluid membranes with polymer lipids subject to tension. *Phys. Rev. E*, 57 :6815–6824.
- [König et al., 1992] König, S., Pfeiffer, W., Bayerl, T., Richter, D., and Sackmann, E. (1992). Molecular dynamics of lipid bilayers studied by incoherent quasi-elastic neutron scattering. *J. Phys. II France*, 2 :1589–1615.
- [Kono et al., 1993] Kono, M., Misra, S., and Ebrey, T. G. (1993). pH dependance of light-induced proton release by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 331 :31–34.
- [Kouyama et al., 1985] Kouyama, T., Bogomolni, R. A., and Stoeckenius, W. (1985). Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 48 :201–208.
- [Kramer, 1971] Kramer, L. (1971). Theory of light scattering from fluctuations of membranes and monolayers. *J. Chem. Phys.*, 55 :2097–2105.
- [Kraus et al., 1996] Kraus, M., Wintz, W., Seifert, U., and Lipowsky, R. (1996). Fluid vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 77 :3685–3688.
- [Kroll and Gompper, 1992] Kroll, D. M. and Gompper, G. (1992). The conformation of fluid membranes : Monte Carlo simulations. *Science*, 255 :968.
- [Kumar and Rao, 1998] Kumar, P. B. S. and Rao, M. (1998). Shape instabilities in the dynamics of a two-component fluid membrane. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :2489–2492.
- [Kummrow and Helfrich, 1991] Kummrow, M. and Helfrich, W. (1991). Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A*, 44 :8356–8360.
- [Kwok and Evans, 1981] Kwok, R. and Evans, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 35 :637–652.
- [Landau and Lifchitz, 1990a] Landau, L. and Lifchitz, E. (1990a). *Fluid mechanics*. Mir.
- [Landau and Lifchitz, 1990b] Landau, L. and Lifchitz, E. (1990b). *Theory of elasticity*. Mir.
- [Lanyi, 1997] Lanyi, J. K. (1997). Mechanism of on transport across membranes : bacteriorhodopsin as a prototype for proton pumps. *J. Biol. Chem.*, 272 :31209–31212.
- [Lawaczeck, 1984] Lawaczeck, R. (1984). Water permeability through biological membranes by isotopic effects of fluorescence and light scattering. *Biophys. J.*, 45 :491–494.
- [Leibler, 1986] Leibler, S. (1986). Curvature instability in membranes. *J. Physique*, 47 :507–516.
- [Leibler and Andelman, 1987] Leibler, S. and Andelman, D. (1987). Ordered and curved mesostructures in membranes and amphiphilic films. *J. Physique*, 48 :2013–2018.
- [Leibler et al., 1987] Leibler, S., Singh, R. R. P., and Fisher, M. E. (1987). Thermodynamic behavior of two-dimensional vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 59 :1989–1992.

- [Levin and Korenstein, 1991] Levin, S. and Korenstein, R. (1991). Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP-dependent dynamic assembly of the membrane skeleton. *Biophys. J.*, 60 :733–737.
- [Levitt, 1984] Levitt, D. (1984). *Current topics in membrane and transport*, volume 21. Academic Press, New York, NY.
- [Lipowsky and Döbereiner, 1998] Lipowsky, R. and Döbereiner, H.-G. (1998). Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys. Lett.*, 43 :219–225.
- [Lipowsky et al., 1998] Lipowsky, R., Döbereiner, H.-G., Hiergeist, C., and Indriani, V. (1998). Membrane curvature induced by polymers and colloids. *Physica A*, 249 :536–543.
- [Lipowsky and Girardet, 1990] Lipowsky, R. and Girardet, M. (1990). Shape fluctuations of polymerized or solidlike membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 65 :2893–2896.
- [Lipowsky and Leibler, 1986] Lipowsky, R. and Leibler, S. (1986). Unbinding transition of interacting membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 56 :2541–2544. errata in Phys. Rev. Lett. 59 p. 1983 (1987).
- [Lipowsky and Sackmann, 1995a] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors (1995a). *Structure and Dynamics of Membranes (From Cells to Vesicles)*, volume vol. 1A. Elsevier Science B.V.
- [Lipowsky and Sackmann, 1995b] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors (1995b). *Structure and Dynamics of Membranes (Generic and Specific Interactions)*, volume vol. 1B. Elsevier Science B.V.
- [Lipowsky and Zielinska, 1989] Lipowsky, R. and Zielinska, B. (1989). Binding and unbinding of lipid membranes : a Monte-Carlo study. *Phys. Rev. Lett.*, 62 :1572.
- [Liu and Plischke, 1992] Liu, D. and Plischke, M. (1992). Monte-Carlo studies of tethered membranes with attractive interactions. *Phys. Rev. A*, 45 :7139–7144.
- [Luecke et al., 1998] Luecke, H., Richter, H.-T., and Lanyi, J. K. (1998). Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science*, 280 :1934–1937.
- [Madigan et al., 1997] Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). *Biology of microorganisms*. Prentice Hall International, Inc., 8th edition.
- [Méléard et al., 1992] Méléard, P., Faucon, J. F., Mitov, M. D., and Bothorel, P. (1992). Pulsed-light microscopy applied to the measurement of the bending elasticity of giant liposomes. *Europhys. Lett.*, 19 :267–271.
- [Méléard et al., 1998] Méléard, P., Gerbeaud, C., Bardusco, P., Jeandaine, N., Mitov, M. D., and Fernandez-Puente, L. (1998). Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie*, 80 :401–413.
- [Méléard et al., 1997] Méléard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M. D., Dufourcq, J., and Bothorel, P. (1997). Bending elasticities of model membranes : influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, 72 :2616–2629.

- [Miao et al., 1991] Miao, L., Fourcade, B., Rao, M., Wortis, M., and Zia, R. K. P. (1991). Equilibrium budding and vesiculation in the curvature model of fluid lipid vesicles. *Phys. Rev. A*, 43 :6843–6856.
- [Michalet et al., 1994] Michalet, X., Bensimon, D., and Fourcade, B. (1994). Fluctuating vesicles of nonspherical topology. *Phys. Rev. Lett.*, 72 :168–171.
- [Miyata and Hotani, 1992] Miyata, H. and Hotani, H. (1992). Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :11547–11551.
- [Morgan et al., 1997] Morgan, J. D., Johnson, C. A., and Kaler, E. W. (1997). Polymerization of equilibrium vesicles. *Langmuir*, 13 :6447–6451.
- [Moroz et al., 1997] Moroz, J. D., Nelson, P., Bar-Ziv, R., and Moses, E. (1997). Spontaneous expulsion of giant lipid vesicles induced by laser tweezers. *Phys. Rev. Lett.*, 78 :386–389.
- [Morse and Milner, 1994] Morse, D. C. and Milner, S. T. (1994). Fluctuations and phase behaviour of fluid membrane vesicles. *Eurphys. Lett.*, 28 :565–570.
- [Morse and Milner, 1995] Morse, D. C. and Milner, S. T. (1995). Statistical mechanics of closed fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 52 :5918–5945.
- [Mouritsen and Bloom, 1993] Mouritsen, O. G. and Bloom, M. (1993). Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22 :145–171.
- [Mueller et al., 1983] Mueller, P., Chien, T. F., and Rudy, B. (1983). Formation and properties of cell-size lipid bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 44 :375–381.
- [Mutz et al., 1991] Mutz, M., Bensimon, D., and Brienne, M. J. (1991). Wrinkling transition in partially polymerized vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 67 :923–926.
- [Mutz and Helfrich, 1989] Mutz, M. and Helfrich, W. (1989). Unbinding transition of a biological membrane. *Phys. Rev. Lett.*, 62 :2881–2884.
- [Mutz and Helfrich, 1990] Mutz, M. and Helfrich, W. (1990). Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the fourier analysis of contour sections. *J. Phys. France*, 51 :991–1002.
- [Naito and Okuda, 1996] Naito, H. and Okuda, M. (1996). Polygonal shape transformation of a circular biconcave vesicle induced by osmotic pressure. *Phys. Rev. E*, 54 :2816–2826.
- [Nallet et al., 1989a] Nallet, F., Roux, D., and Prost, J. (1989a). Dynamic light scattering of dilute lamellar phases. *Phys. Rev. Lett.*, 62 :276–278.
- [Nallet et al., 1989b] Nallet, F., Roux, D., and Prost, J. (1989b). Hydrodynamics of lyotropic smectic : a dynamic light scattering study of dilute lamellar phases. *J. Phys. France*, 50 :3147–3165.
- [Nelson and Peliti, 1987] Nelson, D. R. and Peliti, L. (1987). Fluctuations in membranes with crystalline and hexatic order. *J. Phys. (Paris)*, 48 :1085–1092.
- [Nelson and Powers, 1995] Nelson, P. and Powers, T. (1995). Dynamical theory of the pearling instability in cylindrical vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 74 :3384–3387.

- [Netz, 1997] Netz, R. R. (1997). Inclusions in fluctuating membranes : exact results. *J. Phys. I France*, 7 :833–852.
- [Niggemann et al., 1995] Niggemann, G., Kummrow, M., and Helfrich, W. (1995). The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers : dependance on experimental method, sample cell sealing and temperature. *J. Phys. II France*, 5 :413–425.
- [Oesterhelt and Tittor, 1989] Oesterhelt, D. and Tittor, J. (1989). Two pumps, one principle : light-driven ion transport in halobacteria. *TIBS*, 14 :57–61.
- [Olmsted and MacIntosh, 1997] Olmsted, P. D. and MacIntosh, F. C. (1997). Instability and front propagation in laser-tweezed lipid bilayer tubules. *J. Phys. II France*, 7 :139–156.
- [Pebay-Peyroula et al., 1997] Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., and Landau, E. M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipid cubic phases. *Science*, 277 :1676–1681.
- [Peliti and Leibler, 1985] Peliti, L. and Leibler, S. (1985). Effects of thermal fluctuations on systems with small surface tension. *Phys. Rev. Lett.*, 54 :1690–1693.
- [Péré, 1994] Péré, J.-P. (1994). *La microscopie, techniques d'étude en biologie*. Nathan université.
- [Peterson, 1985a] Peterson, M. A. (1985a). Shape fluctuations of red blood cells. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 127 :159–186.
- [Peterson, 1985b] Peterson, M. A. (1985b). Geometrical methods for the elasticity theory of membranes. *J. Math. Phys.*, 26 :711–717.
- [Peterson, 1985c] Peterson, M. A. (1985c). Shape dynamics of nearly spherical membrane bounded fluid cells. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 127 :257–272.
- [Peterson, 1992] Peterson, M. A. (1992). Linear response of the human erythrocyte to mechanical stress. *Phys. Rev. A*, 45 :4116–4131.
- [Peterson et al., 1992] Peterson, M. A., Strej, H., and Sackmann, E. (1992). Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker amplitudes. *J. Phys. II France*, 2 :1273–1285.
- [Petrov, 1984] Petrov, A. G. (1984). Flexoelectricity of lyotropics and biomembranes. *Il Nuovo Cimento D*, 3 :174–191.
- [Petrov and Sokolov, 1986] Petrov, A. G. and Sokolov, V. S. (1986). Curvature-electric effect in black lipid membranes. *Eur. Biophys. J.*, 13 :139–155.
- [Pieruschka and Wennerström, 1996] Pieruschka, P. and Wennerström, H. (1996). Gaussian random field description of fluctuating fluid vesicles. *Phys. Rev. E*, 53 :2693–2700.
- [Piknova et al., 1993] Piknova, B., Péronchon, E., and Tocanne, J.-F. (1993). Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.*, 218 :385–396.
- [Pincus et al., 1990] Pincus, P., Joanny, J.-F., and Andelman, D. (1990). Electrostatic interactions, curvature elasticity and steric repulsion in multimembrane systems. *Eurphys. Lett.*, 11 :763–768.

- [Pincus and Safran, 1998] Pincus, P. A. and Safran, S. A. (1998). Charge fluctuations and membrane attractions. *Europhys. Lett.*, 42 :103–108.
- [Ploem, 1975] Ploem, J. S. (1975). *Reflection-contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to a glass surface - in : Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [Podgornik and Parsegian, 1992] Podgornik, R. and Parsegian, V. A. (1992). Thermal-mechanical fluctuations of fluid membranes in confined geometries : the case of soft confinement. *Langmuir*, 8 :557–562.
- [Powers et al., 1998] Powers, T. R., Zhang, D., Goldstein, R. E., and Stone, H. A. (1998). Propagation of a topological transition : the rayleigh instability. *Physics of Fluids*, 10 :1052–1057.
- [Press et al., 1992] Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992). *Numerical recipes in C, the art of scientific computing*. Cambridge University Press, 2nd edition.
- [Prost and Bruinsma, 1996] Prost, J. and Bruinsma, R. (1996). Shape fluctuations of active membranes. *Europhys. Lett.*, 33 :321–326.
- [Prost et al., 1998] Prost, J., Manneville, J.-B., and Bruinsma, R. (1998). Fluctuation-magnification of non-equilibrium membranes near a wall. *Eur. Phys. J. B*, 1 :465–480.
- [Rädler and Sackmann, 1992] Rädler, J. and Sackmann, E. (1992). On the measurement of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy. *Langmuir*, 8 :848–853.
- [Rädler and Sackmann, 1993] Rädler, J. and Sackmann, E. (1993). Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. (France) II*, 3 :727–748.
- [Rädler et al., 1995a] Rädler, J., Streyl, H., and Sackmann, E. (1995a). Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir*, 11 :4539–4548.
- [Rädler et al., 1995b] Rädler, J. O., Feder, T. J., Streyl, H. H., and Sackmann, E. (1995b). Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E*, 51 :4526–4536.
- [Ramaswamy, 1992] Ramaswamy, S. (1992). Equilibrium and non-equilibrium dynamics of the dilute lamellar phase. *Physica A*, 186 :154–159.
- [Ramaswamy et al., 1999] Ramaswamy, S., Toner, J., and Prost, J. (1999). in preparation.
- [Reeves and Dowben, 1969] Reeves, J. P. and Dowben, R. M. (1969). Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.*, 73 :49–60.
- [Rigaud et al., 1983] Rigaud, J.-L., Bluzat, A., and Büschlen, S. (1983). Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 111 :373–382.
- [Roux et al., 1994] Roux, D., Safinya, C., and Nallet, F. (1994). *Micelles, microemulsions and monolayers*. Springer-Verlag, 4ème édition.

- [Sackmann, 1989] Sackmann, E. (1989). Molecular and global structure and dynamics of membranes and lipid bilayers. *Can. J. Phys.*, 68 :999–1010.
- [Sackmann, 1994] Sackmann, E. (1994). Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*, 346 :3–16.
- [Sackmann et al., 1986] Sackmann, E., Duwe, H.-P., and Engelhardt, H. (1986). Membrane bending elasticity and its role for shape fluctuations and shape transformations of cells and vesicles. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81 :281–290.
- [Safinya et al., 1986] Safinya, C. R., Roux, D., Smith, G. S., Sinha, S. K., Dimon, P., Clark, N. A., and Bellocq, A. M. (1986). Steric interactions in a model multimembrane system : a synchrotron X-ray study. *Phys. Rev. Lett.*, 57 :2718–2721.
- [Safran, 1994] Safran, S. (1994). *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. Addison Wesley.
- [Safran et al., 1990] Safran, S. A., Pincus, P., and Andelman, D. (1990). Theory of spontaneous vesicle formation in surfactant mixtures. *Science*, 248 :354–356.
- [Sakmann and Neher, 1983] Sakmann, B. and Neher, E., editors (1983). *Single-channel recording*. Plenum.
- [Sandre et al., 1999] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. (1999). Dynamics of transient pores in stretched vesicles. in preparation.
- [Scherrer et al., 1994] Scherrer, P., Alexiev, U., Marti, T., Khorana, H. G., and Heyn, M. P. (1994). Covalently bound pH-indicator dyes at selected extracellular or cytoplasmic sites in bacteriorhodopsin ; 1- proton migration along the surface of bacteriorhodopsin micelles and its delayed transfer from surface to bulk. *Biochemistry*, 33 :13684–13692.
- [Schiessl, 1998] Schiessl, H. (1998). Bending of charged flexible membranes due to the presence of macroions. *Eur. Phys. J. B*, 6 :373–380.
- [Schmidt et al., 1993] Schmidt, C. F., Svoboda, K., Lei, N., petsche, I. B., Berman, L. E., Safinya, C. R., and Grest, G. S. (1993). Existence of a flat phase in red cell membrane skeletons. *Science*, 259 :952–955.
- [Schneider et al., 1984a] Schneider, M. B., Jenkins, J. T., and Webb, W. W. (1984a). Thermal fluctuations of large cylindrical phospholipid vesicles. *Biophys. J.*, 45 :891–899.
- [Schneider et al., 1984b] Schneider, M. B., Jenkins, J. T., and Webb, W. W. (1984b). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Physique*, 45 :1457–1472.
- [Schram and Thompson, 1997] Schram, V. and Thompson, T. E. (1997). Influence of the intrinsic membrane protein bacteriorhodopsin on gel-phase domain topology in two-component phase-separated bilayers. *Biophys. J.*, 72 :2217–2225.
- [Seifert, 1993] Seifert, U. (1993). Curvature-induced lateral phase segregation in two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 70 :1335–1338.

- [Seifert, 1999] Seifert, U. (1999). Fluid membranes in hydrodynamic flow fields : formalism and an application to fluctuating quasispherical vesicles in shear flow. *Eur. Phys. J. B*, 8 :405–415.
- [Seifert and Langer, 1993] Seifert, U. and Langer, S. A. (1993). Viscous modes of fluid bilayer membranes. *Europophys. Lett.*, 23 :71–76.
- [Seigneuret and Rigaud, 1985] Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1985). Use of fluorescent pH probe pyranine to detect heterogeneous directions of proton movement in bacteriorhodopsin reconstituted large liposomes. *FEBS Lett.*, 188 :101–106.
- [Seigneuret and Rigaud, 1986] Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1986). Analysis of passive and light-driven ion movements in large bacteriorhodopsin liposomes reconstituted by reverse-phase evaporation. *Biochemistry*, 25 :6716–6730.
- [Seigneuret and Rigaud, 1988] Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1988). Partial separation of inwardly pumping and outwardly pumping bacteriorhodopsin reconstituted liposomes by gel filtration. *FEBS Lett.*, 228 :79–84.
- [Servuss and Helfrich, 1989] Servuss, R. M. and Helfrich, W. (1989). Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *J. Phys. France*, 50 :809–827.
- [Shahidzadeh et al., 1998] Shahidzadeh, N., Bonn, D., Aguerre-Chariol, O., and Meunier, J. (1998). Large deformations of giant floppy vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 81 :4268–4271.
- [Shechter, 1993] Shechter, E. (1993). *Biochimie et Biophysique des Membranes*. Masson, 2ème édition.
- [Simon et al., 1995] Simon, J., Kühner, M., Ringsdorf, H., and Sackmann, E. (1995). Polymer-induced shape changes and capping in giant liposomes. *Chem. and Phys. of Lipids*, 76.
- [Simons and Ikonen, 1997] Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 :569–572.
- [Singer and Nicolson, 1972] Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 :720–731.
- [Sintes and Baumgärtner, 1998] Sintes, T. and Baumgärtner, A. (1998). Membrane-mediated protein attraction. a Monte-Carlo study. *Physica A*, 249 :571–575.
- [Somoza et al., 1996] Somoza, A. M., Marconi, U. M. B., and Tarazona, P. (1996). Growth in systems of vesicles and membranes. *Phys. Rev. E*, 53 :5123–5129.
- [Spector et al., 1994] Spector, M. S., Naranjo, E., Chiruvolu, S., and Zasadzinski, J. A. (1994). Conformations of a tethered membrane : crumpling in graphitic oxyde ? *Phys. Rev. Lett.*, 73 :2867–2870.
- [Sperotto and Mouritsen, 1991] Sperotto, M. M. and Mouritsen, O. G. (1991). Monte carlo simulation studies of lipid order parameter profiles near integral membrane proteins. *Biophys. J.*, 59 :261–271.

- [Sperotto and Mouritsen, 1993] Sperotto, M. M. and Mouritsen, O. G. (1993). Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two-component lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.*, 22 :323–328.
- [Sternberg et al., 1989] Sternberg, B., Gale, P., and Watts, A. (1989). The effect of temperature and protein content on the dispersive properties of bacteriorhodopsin from *h. halobium* in reconstituted DMPC complexes free of endogenous purple membrane lipids : a freeze fracture electron microscopy study. *Biochim. Biophys. Acta*, 980 :117–126.
- [Stevens, 1972] Stevens, C. F. (1972). Inferences about membrane properties from electrical noise measurements. *Biophys. J.*, 12 :1028–1047.
- [Strey et al., 1995] Strey, H., Peterson, M., and Sackmann, E. (1995). Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophys. J.*, 69 :478–488.
- [Stryer, 1997] Stryer, L. (1997). *La Biochimie*. Flammarion, 4ème édition.
- [Sung and Oh, 1996] Sung, W. and Oh, E. (1996). Membrane fluctuation and polymer adsorption. *J. Phys. II France*, 6 :1195–1206.
- [Svetina and Zeks, 1983] Svetina, S. and Zeks, B. (1983). Bilayer couple hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 42 :86–90.
- [Svetina and Zeks, 1989] Svetina, S. and Zeks, B. (1989). Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur. Biophys. J.*, 17 :101–111.
- [Szoka and Papahadjopoulos, 1980] Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. and Bioengineering*, 9 :467–508.
- [Taniguchi, 1996] Taniguchi, T. (1996). Shape deformation and phase separation dynamics of two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 76 :4444–4447.
- [Tsukita et al., 1993] Tsukita, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. Y. (1993). Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell. Biol.*, 123 :1049–1053.
- [Tuvia et al., 1997] Tuvia, S., Almagor, A., Bitler, A., Levin, S., Korenstein, R., and Yedgar, S. (1997). Cell membrane fluctuations are regulated by medium macroviscosity : evidence for a metabolic driving force. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*, 94 :5045–5049.
- [Umeda et al., 1998] Umeda, T., Nakajima, H., and Hotani, H. (1998). Theoretical analysis of shape transformations of liposomes caused by microtubule assembly. *J. of the Phys. Soc. of Japan*, 67 :682–688.
- [Velikov et al., 1997] Velikov, K., Dietrich, C., Hadjiishy, A., Danov, K., and Pouliquen, B. (1997). Motion of a massive microsphere bound to a spherical vesicle. *Europophys. Lett.*, 40 :405–410.
- [Vodyanoy et al., 1993] Vodyanoy, I., Bezrukova, S. M., and Parsegian, V. A. (1993). Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Size-modulated osmotic action. *Biophys. J.*, 65 :2097–2105.

- [Wang and Safran, 1991] Wang, Z.-G. and Safran, S. A. (1991). Curvature elasticity of diblock copolymer monolayers. *J. Chem. Phys.*, 94 :679–687.
- [Waugh and Evans, 1979] Waugh, R. and Evans, E. (1979). Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophys. J.*, 26 :115–132.
- [Weast, 1989] Weast, R. C., editor (1989). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 69th edition.
- [Wiegand et al., 1998] Wiegand, G., Neumaier, K. R., and Sackmann, E. (1998). Microinterferometry : three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by reflection interference contrast microscopy (RICM). *Applied Optics*, 37 :6892–6905.
- [Winterhalter and Helfrich, 1988] Winterhalter, M. and Helfrich, W. (1988). Effect of surface charge on the curvature elasticity of membranes. *J. Phys. Chem.*, 92 :6865–6867.
- [Winterhalter and Helfrich, 1992] Winterhalter, M. and Helfrich, W. (1992). Bending elasticity of electrically charged bilayers : coupled monolayers, neutral surfaces, and balancing stresses. *J. Phys. Chem.*, 96 :327–330.
- [Wu and MacConnel, 1975] Wu, S. H.-W. and MacConnel, H. M. (1975). Phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry*, 14 :847–854.
- [W.Wintz et al., 1996] W.Wintz, Döbereiner, H.-G., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, 33 :403–408.
- [Xu and Döbereiner, 1999] Xu, L. and Döbereiner, H.-G. (1999). Micromanipulation of tubular vesicles. *Pers. in Supramolecular Chemistry*. to be published.
- [Yeung and Evans, 1995] Yeung, A. and Evans, E. (1995). Unexpected dynamics in shape fluctuations of bilayer vesicles. *J. Phys. II France*, 5 :1501–1523.
- [Youhei, 1994] Youhei, F. (1994). Dynamics of the lipid-bilayer membrane taking a vesicle shape. *Physica A*, 203 :214–242.
- [Zilker et al., 1987] Zilker, A., Engelhardt, H., and Sackmann, E. (1987). Dynamic reflexion interference contrast (RIC)-microscopy : a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. *J. Phys. (Paris)*, 48 :2139–2151.
- [Zilker et al., 1992] Zilker, A., Ziegler, M., and Sackmann, E. (1992). Spectral analysis of erythrocyte flickering in the $0.3\text{--}4 \mu\text{m}^{-1}$ regime by microinterferometry combined with fast image processing. *Phys. Rev. E*, 46 :7998–8001.

Résumé

La bicoche lipidique constitue l'architecture de base des membranes des cellules biologiques et a souvent été utilisée comme modèle physique simple de membrane biologique. Cependant, la physique des membranes cellulaires est compliquée par la présence de protéines qui exercent une activité hors équilibre dans la membrane : les membranes biologiques sont des membranes 'actives'.

Nous présentons un modèle théorique qui prend en compte de façon simplifiée l'activité hors équilibre caractéristique d'une membrane biologique. Grâce à ce modèle, nous étudions les effets de l'activité sur les fluctuations de forme d'une membrane. Le modèle prévoit une amplification des fluctuations lorsqu'un bruit hors équilibre s'ajoute au bruit thermique. Si une membrane active fluctue près d'une paroi, on s'attend à l'apparition d'une nouvelle force répulsive dont la portée peut dépasser celle de la force entropique de Helfrich qui s'exerce sur une membrane à l'équilibre thermodynamique.

Nous avons testé ces prévisions théoriques à l'aide d'un modèle expérimental de membrane active. La bactériorhodopsine, une pompe à protons activée par la lumière, peut être incorporée dans la bicoche lipidique de vésicules géantes unilamellaires. La technique d'aspiration par micropipette permet de quantifier l'excès de surface dû aux fluctuations de forme d'une vésicule quasi-sphérique. Nous avons pu mettre en évidence une forte augmentation de l'excès de surface de la vésicule lorsque la bactériorhodopsine est active. Nos résultats expérimentaux sont en accord qualitatif avec le modèle théorique, qui permet aussi de bien rendre compte de l'ordre de grandeur de l'effet observé.

L'ensemble de ces résultats montre que l'activité hors équilibre modifie qualitativement et quantitativement les fluctuations de forme des membranes lipidiques. Il paraît donc indispensable de tenir compte des phénomènes hors équilibre en vue d'un modèle physique plus complet et réaliste des membranes biologiques.

Mots-clés : Membrane fluctuante - Physique statistique hors équilibre - Activité - Lois d'échelle - Vésicules géantes - Bactériorhodopsine - Micropipettes - RICM.

Abstract

The lipid bilayer is the basic structural element constituting biological membranes. It has been widely used as a simple physical model of cell membranes. However, due to the presence of active proteins inside the bilayer, the physics of biological membranes is more complicated. A biological membrane is a typical example of 'active', *i.e.* non-equilibrium, membrane.

We propose a theoretical model which takes into account in a simplified way the non-equilibrium activity characteristic of biological membranes. This model allows us to study the effects of activity on shape fluctuations of a membrane and predicts that the fluctuations should be amplified when a non equilibrium noise source adds to thermal noise. If a fluctuating active membrane is brought close to a wall, it should also suffer a new long-range repulsive force which can exceed the equilibrium Helfrich force.

To test experimentally these predictions, we have reconstituted a light-driven proton pump, the bacteriorhodopsin, into giant unilamellar phospholipid vesicles. The excess area due to the shape fluctuations of a quasi-spherical vesicle can be quantified by aspiration inside a micropipet. We have shown that the excess area increases when the bacteriorhodopsin is activated. Our experimental results are in qualitative agreement with the theoretical model, which also gives the correct order of magnitude for the observed effect.

These results show that a non-equilibrium activity qualitatively and quantitatively modify the shape fluctuations of lipid membranes. It thus seems essential to include the effects of non-equilibrium phenomena in order to get a more complete and realistic physical description of biological membranes.

Key-words : Fluctuating membrane - Non-equilibrium statistical physics - Activity - Scaling laws - Giant vesicles - Bacteriorhodopsin - Micropipet - RICM.