

## Le phénomène “bouton-pression” dans une phase lamellaire, modèle de membrane biologique\*

N. TAULIER

Laboratoire d'imagerie paramétrique  
U.M.R 7623 C.N.R.S  
15, rue de l'École de Médecine, 75005 Paris, France.

**RÉSUMÉ.** L'hydrophobicité est une notion importante qui est à l'origine de nombreux phénomènes en biologie. Elle permet entre autres de comprendre le comportement des tensioactifs, molécules hybrides constituées d'une partie qui recherche la présence de l'eau et d'une autre qui la fuit. Mélangés dans de l'eau et de l'huile, ils peuvent former des structures lamellaires qui s'avèrent être de bon modèle de membrane biologique. Grâce à ces milieux modèles nous avons pu étudier une protéine majeure du système nerveux central, appelée protéolipide de la myéline. Diverses expériences ont montré que les quatre hélices- $\alpha$  de la protéine rapprochent localement deux lamelles l'une vers l'autre formant ainsi un “bouton-pression”. Ce phénomène induit un comportement universel de la distance  $\bar{d}$  entre les lamelles, en fonction de la densité surfacique de protéine  $C$  de la forme  $\bar{d} \approx C^{-0.5}$ , conforme à un modèle théorique.

*ABSTRACT.* Many of the biological fundamental processes originate from the concept of hydrophobicity. It allows among others, to shed light on the action of surfactants. These molecules are hybrid: their hydrophilic part seeks water, while their hydrophobic one avoids its contact. In presence of well-defined amounts of oil and water, surfactants can assemble into lamellar structures, which mimic acceptable models of the biological membranes. We have investigated the properties of a major membrane protein from myelin of the Central Nervous System, upon insertion into such a system. We have observed that the four hydrophobic  $\alpha$ -helices of the Myelin Proteolipid span the membrane and squeeze the lamellar bilayers in a snap-like manner. This phenomenon induces an universal behavior of the interlamellar distance  $\bar{d}$ , as a function of the protein surface density, scaling as  $\bar{d} \approx C^{-0.5}$ , in agreement with a simple theoretical model.

### 1 Introduction [1]

Des solutions composées essentiellement de liquide (de l'eau par exemple) peuvent atteindre des états très éloignés de l'état liquide par l'ajout de molécules dites amphiphiles ou tensioactives, qui organisent le milieu suivant des structures bien définies. L'origine de ce phénomène provient de l'hydrophobicité, qui distingue les molécules qui “aiment” l'eau (i.e. hydrophiles) des molécules qui en ont une “aversion” (i.e. hydrophobes). D'autres encore se démarquent par le fait qu'elles cumulent les deux affinités précédentes, ce sont les tensioactifs. La notion même d'hydrophobicité est connue depuis fort longtemps. Un exemple classique simple consiste à mélanger de l'eau avec de l'huile: le mélange ne reste jamais stable et démixe. Une molécule d'huile est donc essentiellement hydrophobe. Quant à l'interprétation physique du phénomène, il a fallu attendre plus longtemps pour la trouver et elle a d'ailleurs prêté à certaines confusions. Par exemple, certaines hypothèses suggéraient que les molécules hydrophobes s'attiraient les unes les autres: or il n'en est rien. La seule cause de l'hydrophobicité réside dans la nature des molécules d'eau. Pour le comprendre, il faut rappeler que les molécules

d'eau ( $H_2O$ ) sont des molécules polaires, pouvant établir au plus quatre liaisons hydrogène avec quatre molécules d'eau voisines. A basse température, ces molécules s'arrangent suivant un réseau tétraédrique, chaque molécule ayant quatre premiers voisins, formant ainsi la glace. Si la température augmente, alors l'agitation moléculaire détruit cet ordre en cassant les liaisons hydrogène. Ainsi, la structure tétraédrique disparaît, laissant la place à une structure complètement désordonnée: la glace est devenue liquide. Toutefois seulement 15% des liaisons hydrogène sont détruites lors de la fusion. Les liaisons hydrogène restantes tendent à garder une certaine cohésion à l'ensemble, qui est seulement observable à faible distance sous la forme d'un tétraèdre “fondu”. En résumé, sous forme liquide, l'eau est complètement désordonnée à grande distance, mais il existe un semi-ordre à courte distance.

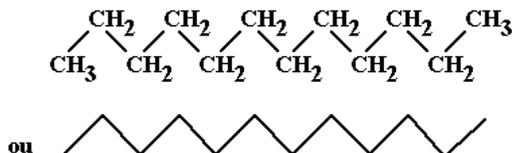
Lorsqu'une molécule d'huile (typiquement une suite de molécules  $CH_2$  de longueur variable, voir figure 1), est plongée dans l'eau, elle va nécessairement rompre des liaisons hydrogène entre molécules d'eau, à cause du volume important qu'elle occupe. Cela “coûte” donc de l'énergie au système, qui le minimisera en expulsant l'huile vers la surface, i.e. à l'interface

eau/air: là où la molécule d'huile détruira le moins de liaisons hydrogène. C'est pourquoi l'huile est toujours expulsée de l'eau vers la surface. A l'opposé, une molécule polaire créera de nouvelles liaisons hydrogène avec l'eau, ce qui compensera celles détruites par le volume qu'elle occupe. Dans ce cas le mélange est stable. Ainsi la notion d'hydrophobicité est liée au degré de polarité des molécules. L'exemple extrême est l'huile qui n'ayant aucune polarité ne se mélange pas avec l'eau.

Cependant un mélange eau+huile peut devenir stable par l'ajout de molécules tensioactives. On ob-

tient alors des microémulsions. Ces dernières ont fait l'objet de recherches soutenues ces vingt dernières années, et qui ont débouché sur de nombreuses applications, que ce soit dans l'industrie pétrolière pour la récupération assistée du pétrole, ou en médecine dans l'encapsulation de médicaments, pour ne citer que ces deux exemples. Dans le paragraphe suivant une description sommaire des microémulsions sera donnée. Le dernier paragraphe illustrera comment une microémulsion sous forme lamellaire, est utilisée comme modèle d'une membrane biologique.

#### HUILE (ici le dodécane)



#### TENSIOACTIF (le $C_{12}E_4$ )

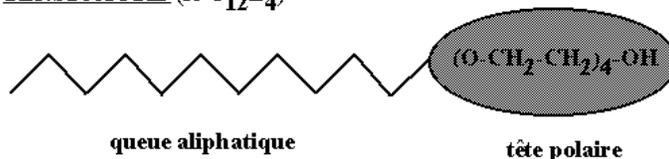


Figure 1: Une huile, ici le dodécane en haut, est une suite de molécules  $CH_2$ , sauf aux extrémités où ce sont des molécules  $CH_3$ . Un tensioactif, comme  $C_{12}E_4$  en bas, est composé d'une tête polaire à laquelle est accrochée une queue hydrophobe, qui n'est autre qu'une huile.

## 2 Les microémulsions

Les deux parties hydrophile (et donc polaire) et hydrophobe du tensioactif sont bien séparées (figure 1). La première est appelée tête polaire.

Outre sa polarité, elle peut être soit non-ionique, ionique ou zwitterionique (possibilité d'acquérir une charge). La seconde n'est autre qu'une huile attachée à cette tête. Elle est généralement appelée queue aliphatique ou queue hydrophobe. Mélangé à de l'eau et de l'huile le tensioactif formera une monocouche à l'interface eau/huile, les têtes étant au contact de l'eau et les queues hydrophobes au contact de l'huile, respectant ainsi l'affinité des deux parties.

Quelques structures possibles de microémulsions sont présentées sur la figure 2.

Toutefois, il arrive que ces structures ne permettent pas de remplir totalement le milieu. Dans ce cas, le mélange devient biphasique (la microémulsion coexiste avec une phase inférieure riche en eau ou supérieure riche en huile), ou triphasique (coexistence avec une phase inférieure riche en eau et une phase supérieure riche en huile). Le choix de la structure dépendra de la concentration et de la géométrie effective du tensioactif. En effet, celui-ci peut être représenté par un cône tronqué qui, selon sa configuration (figure 3), induira une structure micellaire, lamellaire ou micellaire inverse.

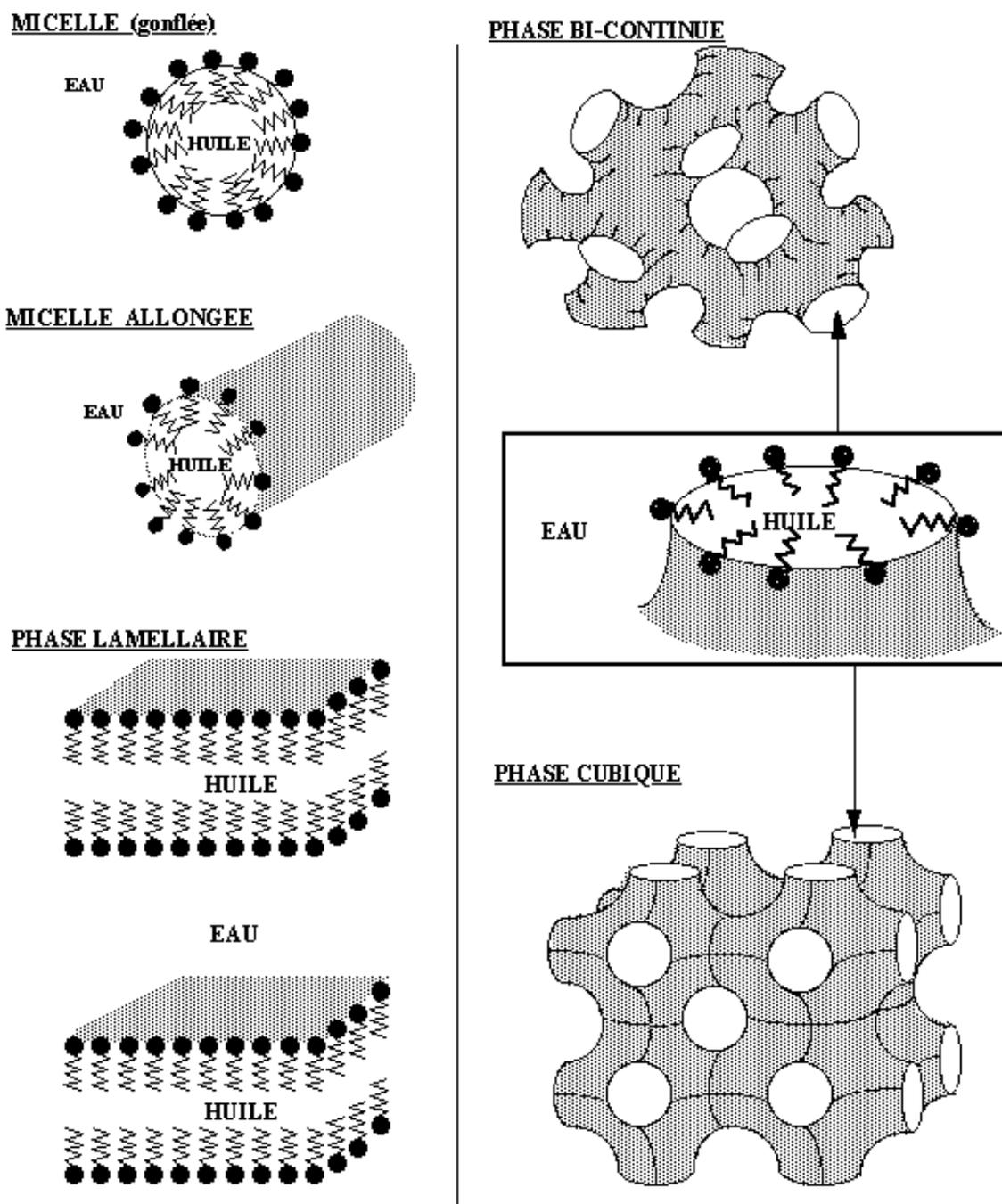


Figure 2: Différentes structures possibles de microémulsions. Pour les structures de gauche le mélange contient plus d'eau que d'huile, mais l'inverse existe aussi. Les structures de droites divisent l'espace en deux volumes pratiquement identiques, l'un contenant uniquement de l'eau, l'autre uniquement de l'huile.

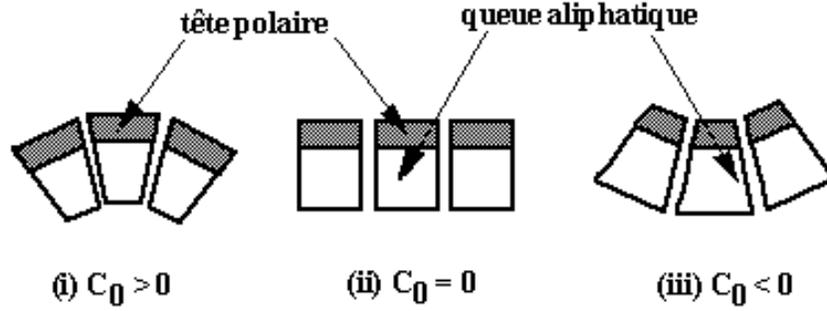


Figure 3: La figure (i) représente des molécules tensioactives dont la géométrie les pousse à adopter une structure du type micellaire, les secondes (ii) préfèrent une forme lamellaire, et pour les troisièmes (iii) ce sera une structure du genre micelle inverse.

De plus, cette géométrie effective dépend de conditions externes comme la température (les chaînes aliphatiques s'étirent ou se ramassent et prendront donc plus ou moins de place), ou encore de la présence de charge (l'aire occupée par la tête polaire dans la monocouche, augmentera ou diminuera suivant la nature et l'amplitude des interactions entre têtes polaires). Par exemple, pour le tensioactif non-ionique  $C_{12}E_4$  (figure 1) il existe une transition d'une phase lamellaire inverse à une phase micellaire pour une température de  $30^\circ C$ . Chaque configuration géométrique induit une courbure spontanée  $c_0$  qui définit la courbure idéale que devrait prendre la monocouche de tensioactif. Cependant la courbure réelle n'est jamais exactement égale à  $c_0$ . Pour rendre compte de la courbure réelle on utilise deux courbures dites principales,  $c_1$  et  $c_2$ , définies comme étant les courbures suivant les deux axes du repère attaché à la surface de la monocouche.

Toutes ces structures sont gouvernées principalement par leur énergie élastique de courbure qui s'écrit:

$$dE = \left[ \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} c_1 c_2 \right] dA \quad (1)$$

où :

- $dA$  est l'élément de surface considérée.
- $\kappa$  est le module de rigidité de courbure moyenne. La monocouche étant dite flexible lorsque  $\kappa \gg k_B T$  et rigide quand  $\kappa \ll k_B T$ .
- $\bar{\kappa}$  est le module de rigidité de courbure gaussienne. Il est lié à la topologie de la structure:
  - si  $\bar{\kappa} \ll 0$  on a plutôt des objets déconnectés et sans bords (ex. les micelles)

- si  $\bar{\kappa} > 0$  on a des structures multiconnectées avec de nombreux passages (ex. la phase bicontinue).

Il est remarquable que le second terme de l'équation (1) soit une constante topologique. En effet, d'après le théorème de Gauss-Bonnet, on a :

$$\int_A c_1 c_2 dA = 4\pi(1 - N) \quad (2)$$

où  $N$  est le nombre d'anses (Par exemple pour une sphère  $N = 0$ , pour un tore  $N = 1$  etc). Par conséquent ce terme n'apporte aucune information (minimisation de l'énergie) tant que l'on ne change pas de structure. Si c'est le cas, les calculs ne porteront que sur le premier terme.

Dans le cas d'une structure lamellaire (courbure spontanée nulle,  $c_0=0$ ), le terme d'énergie de courbure

$$dE = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2)^2 dA \quad (3)$$

qui ne décrit que l'énergie de la bicouche isolée n'est pas suffisant pour décrire le système. En effet, les interactions entre bicouches sont très importantes et doivent être prises en compte. Pour cela il est avantageux de passer dans la représentation de Monge (figure 4). Elle consiste à considérer les bicouches contenues dans le plan  $\widehat{xOy}$  et empilées suivant l'axe  $z$ , les fluctuations des lamelles autour du plan de référence  $\widehat{xOy}$  étant paramétrées par le déplacement  $\vec{u} = u(x, y, z)\vec{z}$ . Dans cette représentation, courbures et déplacement sont reliés par la relation

$$c_1 + c_2 = \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y}$$

L'unique interaction considérée ici est l'interaction stérique d'Helfrich [2]. Elle est la

conséquence directe du fait que les lamelles ondulent (fluctuations thermiques). Les lamelles, gênées dans leur mouvement par le voisinage d'autres lamelles, tentent de repousser ces dernières, exerçant ainsi une force répulsive. Le terme d'énergie s'écrit alors:

$$dE = \left[ \frac{1}{2} \kappa \left( \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 + \bar{B} \left( \frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 \right] dA \quad (4)$$

où le second terme décrit les interactions entre lamelles voisines,  $\bar{B}$  étant le module de compressibilité (à potentiel chimique de tensioactif, dans la monocouche, constant) et, pour des interactions stériques, il vaut:

$$\bar{B} \approx \alpha \frac{\pi^2 (k_B T)}{\kappa d^3} \quad (5)$$

où  $\alpha$  est une constante numérique,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $d$  la période interlamellaire, définie comme étant la somme  $d = \delta + \bar{d}$  (voir figure 4).

D'autres types d'interactions apparaissent lorsque des tensioactifs ioniques ou zwitterioniques sont utilisés, ou si le milieu aqueux présente une quantité appréciable de charge. Ce ne sera pas le cas figuré ici, étant donné que nous utiliserons un tensioactif non-ionique dans un milieu aqueux non chargé.

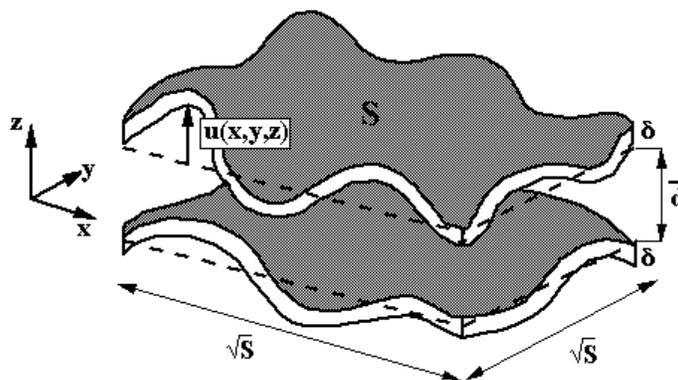


Figure 4: Représentation de Monge: les lamelles ondulent autour de leur plan d'origine, cette variation est décrite par le déplacement  $u(x, y, z)$  suivant l'axe  $z$ . L'épaisseur d'une bicouche est notée  $\delta$  et la distance séparant deux bicouches  $\bar{d}$ .

Un résultat intéressant, que nous utiliserons par la suite, est tiré du modèle [3] d'Helfrich des membranes stabilisées par les ondulations stériques. Ce résultat montre que la valeur moyenne du déplacement  $u$  est, d'une part égale à la distance  $\bar{d}$  séparant deux lamelles, et d'autre part proportionnelle à la plus grande longueur d'onde  $L$  sur laquelle les lamelles fluctuent, c'est-à-dire:

$$L \approx \bar{d} \quad (6)$$

Ici, en l'occurrence, la lamelle peut onduler sur toute sa longueur:  $L \simeq \sqrt{S}$ , où  $S$  représente la surface totale de la lamelle.

### 3 Le phénomène bouton-pression

La myéline est une membrane biologique multilamellaire (figure 5), qui constitue la matière blanche du cerveau et de la moelle épinière, où elle entoure

étroitement l'axone (fibre nerveuse). Elle a, entre autres, un rôle d'isolant électrique, qui maintient la vitesse élevée de l'influx nerveux. La structure de la myéline du système nerveux central est typiquement un empilement de bicouches, elles-mêmes constituées pour 80% de lipides (molécules tensioactives avec deux queues aliphatiques), et pour 20% de protéines. Parmi celles-ci, la protéine basique de la myéline (BMP) et la protéine du protéolipide de la myéline (PLP) en représentent 80%. Le rôle de cette dernière n'est toujours pas élucidé. Cependant il a été suggéré qu'elle joue un rôle important dans le maintien de la compaction de la myéline. Sa séquence en acides aminés est parfaitement connue, et sa structure bidimensionnelle est décrite de la façon suivante: quatre hélices- $\alpha$ <sup>1</sup> hydrophobes transmembranaires (qui représentent 55% de la protéine) qui sont reliées entre elles par des chaînes hydrophiles légèrement chargées (figure 5).

<sup>1</sup>Une protéine ou un peptide sont une suite de plusieurs centaines ou moins d'acides aminés qui peuvent créer entre eux des liaisons hydrogène formant ainsi une hélice. Son pas est variable et dépend de la répétition des liaisons. Par exemple, si les liaisons existent seulement entre les acides aminés et leurs troisièmes voisins, l'hélice est dite hélice- $\alpha$ .

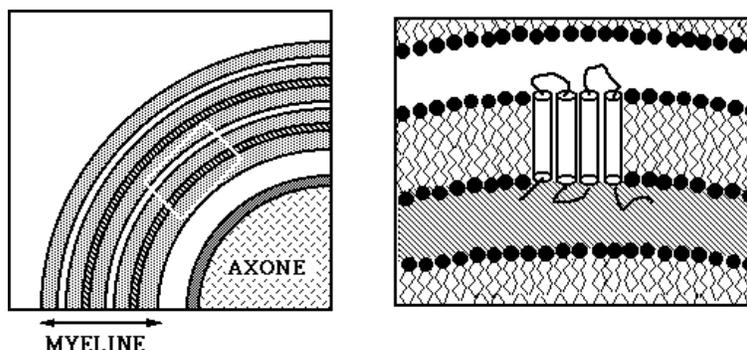


Figure 5: A gauche est représentée la coupe d'un quart de l'axone, entouré par la myéline. Un espace extra cellulaire sépare l'axone de la myéline. Cette dernière est composé d'un empilement de bicouches séparées successivement par un milieu intérieur (en hachuré noir) et par un milieu extérieur (en blanc). La protéine du protéolipide est représentée sur le schéma à droite, les hélices- $\alpha$  qui la constitue sont représentées par des cylindres. C'est une protéine transmembranaire: elle traverse la bicouche.

Comme le montre la figure 5, la structure générale de la myéline est similaire à une phase lamellaire modèle décrite dans le chapitre précédent. Aussi, nous nous proposons d'étudier le comportement de la protéine du protéolipide, insérée dans un tel milieu modèle, afin de tirer éventuellement des enseignements quant à sa fonction dans la myéline.

Le système modèle retenu, consiste en une phase

lamellaire composée d'un tensioactif non-ionique,  $C_{12}E_4$ , d'eau et de dodécane (figure 6). La quantité d'huile (dodécane) est très importante par rapport à celle de l'eau. Ce choix tient compte du fait que cette protéine, en grande partie hydrophobe, "n'aime pas" l'excès d'eau. Les bicouches sont ici constituées de deux monocouches de tensioactifs entourant une couche d'eau et séparées les unes des autres par du dodécane.

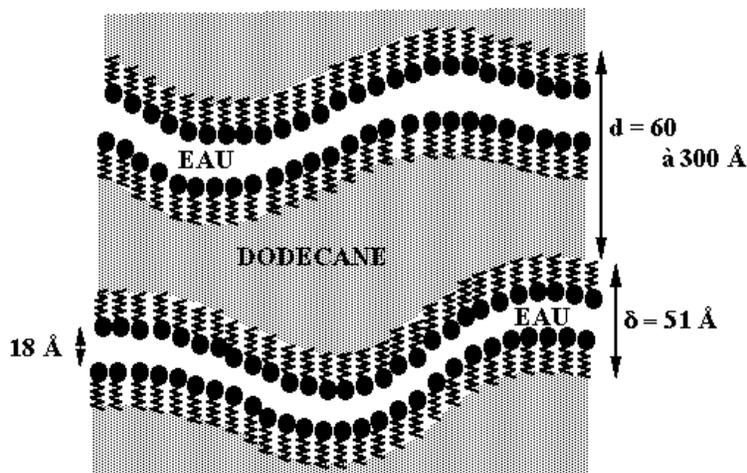


Figure 6: Phase lamellaire inverse utilisée, la lamelle est composée de deux monocouches de tensioactif,  $C_{12}E_4$ , et d'une épaisseur d'eau. les lamelles sont séparées par du dodécane dont la quantité règle la distance séparant les bicouches.

La question posée est de savoir comment cette phase lamellaire modèle va être modifiée par l'insertion de la protéine. La première expérience réalisée, consiste à incorporer la protéine dans la phase lamellaire et à observer les changements éventuels survenus au cours du temps. Dans ces conditions, on note l'apparition d'une deuxième phase

isotrope au-dessus de la phase lamellaire. Des analyses montrent que cette phase isotrope ne contient ni protéine, ni tensioactif. De plus, des expériences de diffusion de rayons X aux petits angles ont été effectuées sur des échantillons de la phase lamellaire inférieure. Elles permettent d'accéder à la période interlamellaire  $d$  (somme de l'épaisseur  $\delta$  de la bi-

couche et de la distance séparant deux bicouches  $\bar{d}$ ), à partir de la position du maximum du pic de Bragg  $q_0$  (figure 7) par la formule:

$$d = \frac{2\pi}{q_0} \quad (7)$$

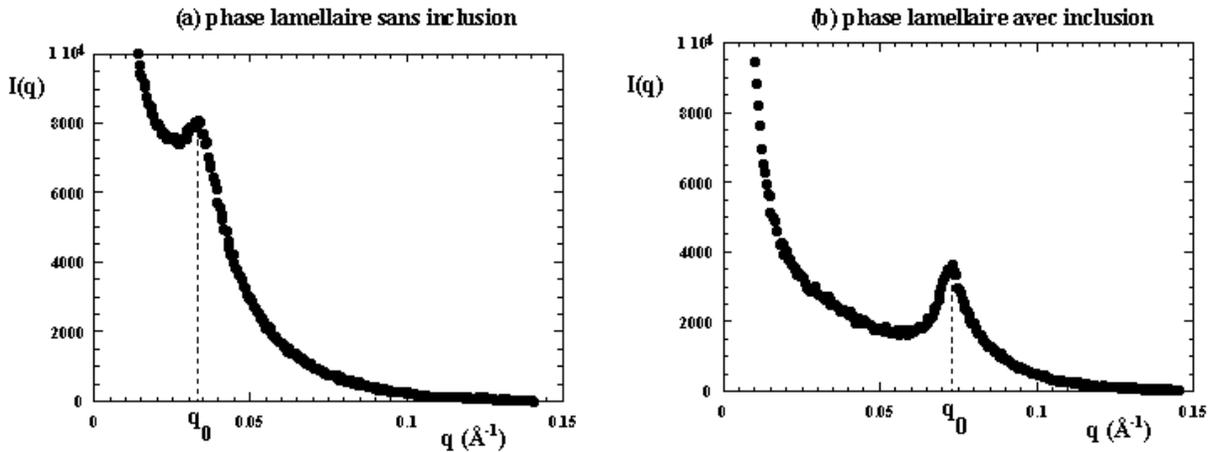


Figure 7: le spectre (a) représente une phase lamellaire inverse; dans le spectre (b) il s’agit de la même phase lamellaire mais après inclusion de protéine. L’augmentation de  $q_0$  montre le resserrement des lamelles (équation 7).

Une décroissance de cette période est observée quand la densité surfacique de protéine  $C$  sur la membrane augmente, et se comporte comme  $C^{-0.5}$  (figure 8) [4].

Ces expériences peuvent s’expliquer simplement si l’on suppose que la protéine rapproche localement deux bicouches l’une vers l’autre, jouant ainsi le rôle d’un “bouton-pression” (figure 9). Ainsi, la distance entre lamelles décroît, réduisant le volume de dodécane entre elles. L’excès de dodécane est expulsé à la surface pour former la phase isotrope supérieure. La protéine est localisée de façon à ce que les hélices hydrophobes soient en contact avec le dodécane et les parties hydrophiles au contact de l’eau.

Quant à l’allure de la courbe de la figure 8, elle s’explique à partir du modèle d’Helfrich[3]. En effet, si des inclusions du type bouton-pression sont insérées de manière homogène dans la phase lamellaire, la membrane est empêchée d’onduler sur toute sa longueur, elle ne peut le faire librement qu’entre deux inclusions. Par conséquent la plus grande longueur d’onde sur laquelle la membrane fluctue est de l’ordre de la distance moyenne  $l$  séparant deux inclusions. D’après l’équation (6) on a :

$$l \approx \bar{d} \quad (8)$$

Par ailleurs, la surface totale de la bicouche valant  $S = n.l^2$ , où  $n$  est le nombre d’inclusions, on obtient en utilisant (8):

$$\bar{d} \approx \sqrt{\frac{n}{S}} \propto C^{-0.5} \quad (9)$$

Ce résultat implique l’hypothèse que les protéines ne s’agrègent pas sur la membrane. Des expériences de cryofracture montrent au microscope électronique qu’en effet ces protéines ont une distribution désordonnée et ne s’agrègent pas. Finalement, la période interlamellaire s’écrit:

$$d = \delta + A(T, \kappa)C^{-0.5} \quad (10)$$

L’ajustement de la courbe expérimentale par cette fonction est donnée dans la figure 8. La courbe passe relativement bien par les points expérimentaux, ce qui confirme notre hypothèse de resserrement de la distance entre les lamelles par la formation de “bouton-pression” de protéine.

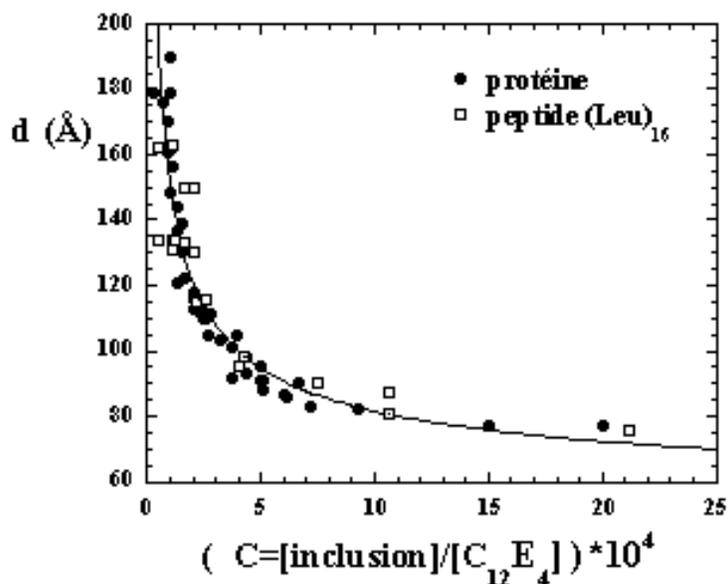


Figure 8: Comportement de la période interlamellaire lors de l'insertion de la protéine du protéolipide de la myéline et d'un peptide dont l'hélice centrale est très hydrophobe. Les deux comportements sont identiques et sont bien ajustés par l'équation (10), ligne continue. Cet ajustement donne une valeur de 50 Å, en accord avec les mesures de loi de dilution.

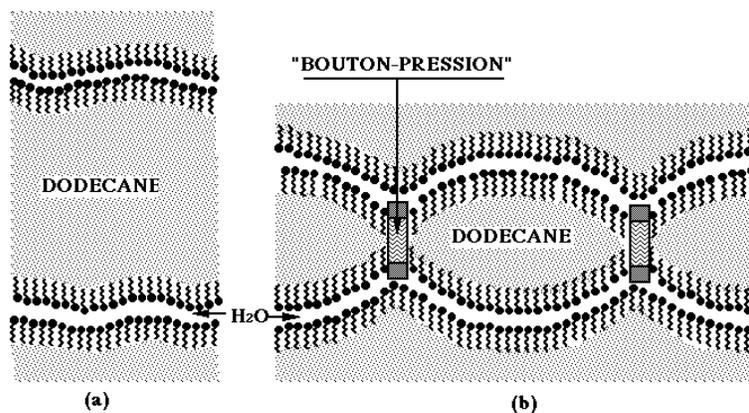


Figure 9: La figure (a) représente la phase lamellaire inverse. La figure (b) la même phase après insertion de la protéine protéolipide, qui rapproche les deux lamelles formant ainsi un "bouton-pression".

La protéine du protéolipide n'est pas la seule macromolécule à induire ce phénomène. Nous avons également observé un comportement identique (figure 8) pour des peptides présentant une hélice- $\alpha$  très hydrophobe (constituée d'acides aminés Leucine) avec deux extrémités hydrophiles, à condition toutefois que la longueur de l'hélice soit suffisante (supérieure à deux fois la longueur de la queue hydrophobe du détergent). Par contre, le phénomène ne se produit pas pour un peptide ayant une hélice- $\alpha$  moins hydrophobe. Il existe donc un seuil d'hydrophobicité. De plus, pour des molécules organiques synthétisées non hélicoïdales, mais ayant la même structure hydrophile/hydrophobe/hydrophile,

le phénomène "bouton-pression" n'est pas évident. Il semble donc que la structure générale hydrophile/hydrophobe/hydrophile ne soit pas une condition suffisante pour assurer la formation de "bouton-pression". D'autres conditions sont sans doute nécessaires, par exemple la présence d'une hélice- $\alpha$ , mais elles n'ont pas encore été clairement définies.

#### 4 Conclusion

L'utilisation de milieux modèles est extrêmement utile pour l'étude des propriétés des protéines membranaires, même si ils sont relativement simples par

rapport à la complexité des membranes biologiques qui contiennent généralement plusieurs dizaines de lipides différents, ainsi que de nombreuses protéines. Cependant, ce système modèle permet de mettre en évidence des propriétés intéressantes. Par exemple, dans le travail présenté ici, nous avons montré que le protéolipide de la myéline agit comme un “bouton-pression” dans un système modèle. Il est donc possible que ce comportement reflète une fonction biologique en relation avec la structure de la myéline. Par ailleurs, nous avons également observé ce comportement pour des peptides. Nous l’avons caractérisé: sa période interlamellaire suit une loi universelle en puissance de  $C^{-0.5}$ . Nous avons enfin fourni un modèle en accord avec ces résultats. Cependant des expériences en cours montre que ce modèle est trop “naïf”. Par exemple, il ne prend pas en compte la dimension du “bouton-pression”, mais l’amélioration de ce modèle est loin d’être trivial. Par ailleurs, des expériences sont toujours en cours pour déterminer les grandeurs physiques pertinentes

qui permettront de savoir quand une macro-molécule du type hydrophile/hydrophobe/hydrophile pourra ou non former un “bouton-pression”.

**Remerciements:** *Je tiens à remercier C.Nicot, M.Waks et W.Urbach pour toute l’aide qu’ils m’ont apporté dans la rédaction de cet article.*

### Références

- [1] Le livre de référence sur l’hydrophobicité est: “The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes”, C.Tanford, ed John Wiley and sons, 2nd.
- [2] W.Helfrich, Z. Naturforsch, 33a, 305-315 (1978).
- [3] W.Helfrich et al, IL NUOVO CIMENTO, vol.3 D, N1 (1984).
- [4] C.Nicot, M.Waks, R.Ober, T.Gulik-Krzywicki and W.Urbach, PRL, vol 77, N 16, p 3485 (1996).

*Séminaire présenté à la Fondation Louis de Broglie le 15 juin 1998.*