

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Physique des Liquides

présentée par

M Jacques Pécéréaux

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

**Mesure du spectre de fluctuations de vésicules
géantes par analyse de contours ;
application aux membranes passives et actives**

soutenu le 15 Mars 2004

devant le jury composé de :

Melle.	P.	Bassereau	Directrice de thèse
M.	J.	Daillant	Rapporteur
M.	A.	Schröder	Rapporteur
M.	J.-F.	Joanny	Examineur
M.	G.	Porte	Examineur
M.	H.-G.	Döbereiner	Examineur
M.	J.-C.	Olivo-Marin	Examineur

A Magaly, Caroline et Blandine

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire physico-chimie Curie sous la direction de Patricia Bassereau. En premier lieu je voudrais la remercier de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir donné tous les moyens pour effectuer ce travail dans d'excellentes conditions. En particulier je voudrais souligner la liberté qu'elle m'a laissée dans mon travail de recherche, tout en veillant à maintenir le cap afin d'arriver finalement au but.

Mes remerciements vont aussi à Jacques Prost qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant de toute l'aide qu'il m'a apportée non seulement pour appréhender les parties théoriques du sujet mais aussi pour les nombreuses discussions que nous avons eues et qui m'ont souvent permis d'avancer sur le plan expérimental.

Jean-François Joanny m'a fait l'honneur de présider mon jury et je l'en remercie. Depuis son arrivée à l'Institut Curie il a porté un vif intérêt aux membranes actives et ses conseils m'ont été fort utiles dans la mise en place de l'analyse des contours.

Hans-Günther Döbereiner a participé à la mise en place de cette technique depuis le début. Il m'a non seulement donné son algorithme comme base de départ, mais m'a aussi fait profiter de son expérience au cours de l'élaboration du système et notamment de la partie reconnaissance et analyse de contours et je l'en remercie.

Je tiens à remercier Jean Daillant et André Schröder d'avoir été mes rapporteurs ainsi que de l'enthousiasme qu'il ont montré pour mon sujet. Leurs idées et suggestions m'ont permis de donner à ce manuscrit sa forme finale et d'initier l'exploration de nouvelles pistes dans la compréhension de nos résultats sur les membranes actives. Je remercie également Grégoire Porte, Jean-Christophe Olivo-Marin d'avoir accepté de faire partie du jury.

La mise au point du nouveau mode de préparation des protéoliposomes géants n'aurait pas été possible sans le concours de Jean-Louis Rigaud qui m'a tout d'abord donné de la protéine, mais aussi qui m'a aidé et conseillé pour la fabrication des petits liposomes contenant la bactériorhodopsine. Qu'il en soit remercié. Je tiens aussi à remercier Daniel Levy qui a réalisé le marquage FITC de la protéine, ainsi que Philippe Girard qui a réalisé les tests sur la reconstitution en petites vésicules.

Je remercie aussi David Lacoste avec qui j'ai collaboré pour l'adaptation de l'expression du spectre de fluctuations des membranes actives ainsi que le calcul dans le cas actif des fonctions d'autocorrélation.

Mes remerciements vont aussi à Jean-Baptiste Manneville qui m’a fait faire mes premiers pas dans le monde des vésicules géantes.

Cette thèse a été financée successivement par la délégation générale à l’armement (DGA), l’Association pour la recherche contre le cancer (ARC), et finalement par l’école doctorale de l’École Polytechnique. Je tiens à remercier ces organismes de leur soutien financier sans lequel cette thèse n’aurait pu aller à son terme.

Merci aussi à toute l’équipe de Patricia pour la très bonne ambiance dans laquelle ce travail s’est fait et les nombreux échanges enrichissants que nous avons eus : Cécile Leduc dont j’ai partagé avec grand plaisir le bureau, Aurélien Roux pour tous ses conseils de biologiste, Jérôme Solon avec qui j’ai eu plaisir à travailler et collaborer, Philippe Girard pour tout le travail sur la caractérisation de la reconstitution de la BR en GUV, Pierre Nassoy dont les conseils ont été précieux, et aussi Sébastien Pierrat, Giovanni Cappello, Aurélie Dornier, Damien Cuvelier, Pia Streicher, Olivier Gareil, Reagan Bussy-Socrate, Faris que j’ai eu plaisir à côtoyer quotidiennement.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire passés et présents que j’ai eu plaisir à voir chaque jour et en particulier :

Albrecht Ott pour tout le matériel de microscopie que je lui ai souvent emprunté, Cyril Comlumbo et Mathilde Badoual pour les discussions que nous avons pu avoir et qui m’ont permis d’avancer dans mon sujet.

Pierre-Henry Puech pour son soutien discret mais efficace ainsi que les discussions que nous avons pu avoir et qui m’ont permis de clarifier la physique des membranes, Olivia du Roure, fort agréable voisine de bureau, pour ses conseils dans la fabrication des surface greffées.

Jacques Malthête pour ses conseils sur tous les points plus «chimiques» de ma recherche.

François Amblard pour l’intérêt qu’il a porté à mon sujet, et le soutien qu’il m’a apporté, ainsi que François Waharte avec qui j’ai eu plaisir à partager mon bureau au début de ma thèse.

Ottman Bouloussa pour son hospitalité lors de ses repas le soir au laboratoire et son soutien dans les derniers mois de ma thèse, ainsi que les étudiants du groupe Rondelez, Nicolas Faure, Manuel Froment, David Pointu pour les moments conviviaux que nous avons pu partager ensemble.

Michel Petit, Gilles Rousseaux, Jean Hugues Codarbox pour toute les pièces mécaniques et électroniques sans lesquelles mes expériences n’auraient pu se faire. Patrick Suchet pour tous les dépannages quotidiens qui m’ont rendu les choses souvent beaucoup plus facile. L’équipe d’informaticiens de l’Institut et en particulier Jean-Gabriel Dick et Stéphane Tsacas pour leurs nombreux conseils et leur patience face à un gros consommateur de ressources de calcul et réseau.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m’ont beaucoup soutenu au cours de ces années de thèse, notamment lors d’une passe difficile où la santé m’a fait défaut et en particulier Estelle Derigny, Maud Lasterre, Bertrand Pouderoux et Pierre-Vital Cochard. Je dédie ce manuscrit à trois de ces amis, Magaly Malet, Caroline Dingreville et Blandine Méha qui m’ont particulièrement soutenu au temps des difficultés et sans le soutien de qui je n’aurais sans doute pas eu la persévérance

de mener ce travail à son terme.

Table des matières

Remerciements	i
table des matières	v
Avant-Propos	xiii
I Introduction	1
I.1 Les vésicules géantes à l'équilibre et hors-équilibre	3
A. De la molécule amphiphile à la vésicule	3
A.1 La vésicule, une phase particulière des lipides dans l'eau	4
B. Propriétés physico-chimiques des vésicules géantes	8
B.1 Modélisation physique de la vésicule	8
B.1.1 Une membrane fluide à l'échelle microscopique	8
B.1.2 La membrane à l'échelle macroscopique : un milieu continu	11
B.1.3 Premières théories sur l'énergie élastique d'une membrane	11
B.1.4 Vers le modèle ADE	14
B.1.5 La tension	14
B.2 Conséquences physiques	16
B.2.1 Spectre de fluctuations, excès d'aire	16
B.2.2 Formes des vésicules	18
B.2.3 Quelques paramètres modifiant les paramètres physiques	22
B.3 Influence de la composition	23
B.4 Inclusions de protéines ou de peptides dans les membranes	26
B.4.1 Cas général	26

B.4.2	Cas particulier des protéines membranaires	28
B.5	D'autres sortes de vésicules géantes	29
B.5.1	Vésicules et protéines solubles	29
B.5.2	Vésicules décorées de polymères	30
B.5.3	Polymersomes	30
B.5.4	Membranes lipidiques polymérisées	32
C.	Diverses techniques d'investigation des vésicules géantes	32
C.1	Observation directe, reconnaissance de contours	32
C.2	Expériences de micropipettes	32
C.3	Tubes de membranes	33
C.4	Diffusion de billes	33
C.5	<i>Reflexion Contrast Interference Microscopy</i>	33
C.6	Méthode d'étude en microscopie confocale	33
C.7	Flux hydrodynamique	35
C.8	Déformation sous champ magnétique/champ électriques	35
D.	Quelques applications, intérêt pour la biologie	36
D.1	Système modèle	36
D.2	Système biomimétique	36
I.2	Les membranes actives	39
A.	Modèle théorique des membranes actives	39
A.1	Equations des membranes actives	40
A.1.1	Hamiltonien	40
A.1.2	Equation de perméation	42
A.1.3	Equation de Stokes	42
A.1.4	Equations Complémentaires	43
A.2	Equations de Langevin, spectre de fluctuations et fonction d'auto- corrélation temporelle des fluctuations	44
A.2.1	Equations de Langevin	44
A.2.2	Spectre de Fluctuation	45
A.2.3	Fonction d'autocorrélation à temps inégaux	46
A.3	Ordres de grandeur et conséquences	47

A.3.1	Ordre de grandeur des paramètres dans le cas de la bactériorhodopsine	47
A.3.2	Simplifications du spectre	48
B.	Mise en évidence expérimentale préexistante	48
B.1	Principe de la technique de micropipettes	50
B.2	Résultats dans le cas de la BR	51
B.2.1	Excès de surface prédit par la théorie	51
B.2.2	Valeurs obtenue expérimentalement	51
B.3	Expérience de micropipette sur la ATPase- Ca^{2+}	53
C.	Vers l'analyse de contour	53

II Techniques de reconnaissance de contours 55

II.1 Mesure du spectre de fluctuations et des fonctions d'autocorrélation : historique et état de l'art 57

A.	Premières applications de l'analyse d'images à l'analyse des fluctuations	57
A.1	Travaux sur les globules rouges	57
A.2	Travaux sur les vésicules géantes	58
A.2.1	Détection de quelques points particuliers du contour	58
A.2.2	Détection de portions de contours	58
B.	Vers des méthodes plus fines	59
B.1	Analyse des fluctuations	61
B.1.1	Diffusion des objets eux-mêmes	61
B.1.2	Fluctuation locale de la membrane d'un objet	61
B.2	Analyse de la forme du globule rouge	61
B.3	Analyse de contours complets de vésicules géantes	64
B.3.1	Diverses méthodes de reconnaissance développées par le groupe de E. Sackmann	64
B.3.2	Méthode développée le groupe de Bordeaux (Faucon, Bivas et Méléard)	68
B.3.3	Méthode développée par Döbereiner et al.	69
B.4	D'autres méthodes d'analyse des fluctuations	73
C.	Méthodes actuelles de reconnaissance de contours	74

II.2 De la vésicule fluctuante au fichier de contours	77
A. Obtention d'une image de la vésicule dans la mémoire de l'ordinateur .	78
A.1 Formation et caractéristiques d'une image de la vésicule en contraste de phase	78
A.1.1 Principaux éléments du dispositif expérimental	78
A.1.2 Formation d'une image en contraste de phase	79
A.1.3 Modélisation de l'image d'une vésicule en contraste de phase	81
A.2 Acquisition d'une image par la caméra	84
A.2.1 Caméra analogique	84
A.2.2 Caméra digitale, amélioration apportées à l'acquisition .	87
A.3 Carte d'acquisition d'image	88
A.3.1 Cartes à entrée analogique (caméra analogique)	89
A.3.2 Carte digitale (caméra digitale)	89
B. Reconnaissance du contour	92
B.1 Acquisition des images et stockage provisoire	92
B.1.1 Le principe	92
B.1.2 Implémentation et optimisation	92
B.2 Analyse du contour	95
B.2.1 Première méthode utilisée	95
B.2.2 La méthode actuelle	99
B.2.3 Avantages et pistes d'amélioration	103
II.3 Traitement et analyse	105
A. Sélection des contours	105
A.1 Par le périmètre du contour	105
A.1.1 Principe	105
A.1.2 Implémentation	107
A.1.3 Limites	107
A.2 En bornant les valeurs des amplitudes des modes	108
A.2.1 Principe et implémentation	108
A.2.2 Limites	109
A.3 Distribution Gaussienne des valeurs des modes	109

A.3.1 Principe et implémentation	110
A.3.2 Limites	110
B. Analyse de Fourier	110
B.1 Spectre de fluctuations - Comparaison avec les expressions pour des membranes planes	110
B.1.1 Principe et implémentation	110
B.1.2 Passage des séries de Fourier aux transformées de Fourier - Membrane de taille finie	112
B.1.3 Incidence de la courbure sur le début du spectre de fluctuation théorique	113
B.1.4 Topologie des vésicules - comparaison des spectres de fluctuations pour une membrane plane et en géomé- trie sphérique	115
B.1.5 Contour observé dans le plan équatorial de la vésicule .	117
B.1.6 Intégration en temps	119
B.1.7 Précision de la détection; limitation des spectres	120
B.1.8 Domaine de validité de la comparaison du spectre ob- tenu expérimentalement avec les modèles théoriques .	123
B.2 Erreurs de mesure sur le spectre de fluctuation	124
C. Conclusion	128

III Mesures 129

III.1 Dispositif Expérimental 131

A. Fabrication des liposomes géants	131
A.1 Préparation des solutions	132
A.1.1 Solution Stock	132
A.1.2 Solution courante	132
A.2 Fabrication du dépôt sur la lame de pousse	132
A.2.1 Dépôt	132
A.2.2 Séchage	133
A.3 Electroformation des GUVs	133
B. Système expérimental	134
B.1 Cellule d'observation	134

B.2	Protocole de fabrication et de remplissage de la cellule d'observation	136
B.2.1	Traitement au PEG	136
B.2.2	Transfert des vésicules	137
B.2.3	Observation et choix de la vésicule	137
III.2	Un modèle de vésicule active	139
A.	La bactériorhodopsine, origine et structure	139
A.1	Origine de la Bactériorhodopsine	139
A.2	Structure	140
B.	Fonctionnement de la BR	143
B.1	Relation structure-fonction	143
B.2	Cycle de fonctionnement	144
C.	Dépendance avec le milieu environnant	145
D.	Marquage de la protéine	152
D.1	Le marquage	152
D.2	Limites de ce système	153
D.3	Améliorations possibles	154
E.	Fabrication de protéoliposomes géants	154
E.1	Ancienne méthode (Manneville, Levy et Rigaud)	155
E.1.1	Solution de lipides et BR	155
E.1.2	Limites	155
E.2	Nouvelle méthode de préparation des protéoliposomes géants	156
E.2.1	Solubilisation de la protéine	158
E.2.2	Reconstitution en petits liposomes	158
E.2.3	Le dépôt	159
E.3	Tests de la nouvelle méthode	159
E.3.1	Vésicules purement lipidiques	159
E.3.2	Absence d'aggrégats de BR dans la membrane	160
E.3.3	Contrôle de la quantité de BR incorporée	160
E.3.4	Contrôle de l'activité de la BR reconstituée	161
E.3.5	incorporation symétrique	163
E.4	Conclusion	165

III.3 Mesures sur des vésicules passives	167
A. Protocole expérimental, traitement des données et analyse	167
A.1 Adaptation du protocole expérimental	167
A.2 Traitement des contours	169
A.3 Analyse	169
A.3.1 Expression du spectre de fluctuations	169
A.3.2 Calcul des erreurs	171
A.3.3 Procédure de fit	172
A.3.4 Effet de la gravité	172
B. Résultats	174
B.1 Mesures des rigidités de courbure	174
B.2 Conclusion	177
III.4 Mesures sur les vésicules hors-équilibre	181
A. Membranes actives contenant une pompe	181
A.1 Spectre de fluctuations ; résultats attendus	181
A.1.1 Spectre de fluctuations du contour dans le plan diamétral	181
A.1.2 Prise en compte de l'intégration en temps	185
A.2 Compléments sur le protocole de préparation	185
A.2.1 Solutions utilisées	185
A.2.2 Éclairage de la préparation	186
A.2.3 Obtention de vésicules fluctuantes	186
A.3 Méthode complémentaire d'analyse des résultats	187
A.3.1 Calcul des erreurs	187
A.3.2 Résultat brut, introduction d'une correction du bruit .	187
A.4 Résultats	189
A.4.1 Effet de la présence des protéines	190
A.4.2 Effet du gradient électrochimique et/ou du potentiel transmembranaire.	192
A.4.3 Effet de l'activité de la Bactériorhodopsine	192
A.5 Conclusion	197
B. Membranes hors équilibre par apport de lipides	198
B.1 Mesures effectuées dans un régime quasi à l'équilibre	200

B.1.1	Périmètre du contour	200
B.1.2	Spectre de fluctuation moyenné sur des temps courts . .	200
B.2	Etude des premiers modes et de leurs fluctuations	201
B.2.1	Utilisation des critères de changements de forme à l'équi- libre	202
B.3	Fonction d'autocorrélation temporelle des modes	203
B.3.1	Principe	204
B.3.2	Validation sur les membranes passives	205
B.3.3	Résultat sur le système hors équilibre	207
B.4	Conclusion	207
IV	Conclusion	209
V	Annexes	215
1	Version originelle de la chambre d'observation	217
A.	Cellule d'observation	217
B.	Simplification de la partie flux	219
C.	Climatisation de la pièce	219
VI	Tables et index	221
	Abbreviations et notations utilisées	223
	Index	227
	Table des figures	229
	Table des tableaux	233
	Bibliographie	235

Avant-Propos

Depuis une trentaine d'année les membranes lipidiques se sont imposées comme un système de choix non seulement pour l'étude des systèmes biomimétiques, mais aussi pour la compréhension de problèmes plus physiques. En effet la physique de ces objets s'est révélée riche, avec des conditions d'expériences relativement faciles. En effet, dans le cas des vésicules géantes, un simple microscope suffit à leur observation. Leurs propriétés à l'équilibre dans diverses situations ont été l'objet de nombreux travaux et donne lieu à une bibliographie riche.

Les vésicules géantes sont de taille similaire à la cellule et ont été largement utilisées pour l'étude des membranes plus ou moins complexes. Portant ce n'est que récemment que la physique des membranes «actives» est née, inspirée par les membranes biologiques, et que leur étude a commencé. En effet, dans la cellule, de nombreuses protéines transmembranaires sont insérées dans la bicouche qui délimite la cellule ; toutes ces protéine remplissent des fonctions très variées dans la cellule mais ont pour la plupart la propriété de consommer de l'énergie pour remplir cette fonction. Cela amène donc la membrane plasmique loin de l'équilibre thermodynamique. Il paraît donc pertinent d'avoir développé un modèle sur les vésicules pour rendre compte simplement des conséquences de l'activité d'une protéine sur la membrane.

Nous nous restreindrons dans ce travail aux conséquences de la mise hors équilibre de la membrane sur les fluctuations en particulier. En effet, la membrane lipidiques est un système à très faible tension de surface dont la physique à l'équilibre thermodynamique est dominée par les fluctuations d'origine thermique, un mouvement perpétuel de la membrane sous l'effet du mouvement brownien des molécules du solvant. L'effet de l'activité d'une protéine a déjà été mis en évidence dans des travaux antérieurs faits au laboratoire. Nous avons souhaité permettre une étude plus poussée des membranes actives et nous avons développé pour cela un nouvel outil d'étude, en poussant les limites de la technique d'analyse de contours pour mesurer en particulier le spectre de fluctuations. Des premiers résultats seront présentés sur un exemple de membrane active, ainsi qu'une application de notre technique à un autre type de membrane hors-équilibre.

Dans une première partie nous passerons en revue les principales propriétés des vésicules lipidiques ainsi que leurs techniques d'étude les plus courantes. Ensuite nous nous intéresserons plus particulièrement au cas des membranes actives, nous présenterons le modèle théorique disponible et les résultats déjà obtenus. Dans une seconde partie après des rappels sur le développement de la technique au cours des

20 dernières années, nous développerons les détails de la technique de reconnaissance et d'analyse de contours que nous avons mise au point pour l'étude de vésicules en microscopie à contraste de phase. Dans une troisième partie, après avoir présenté les systèmes expérimentaux mis au point en particulier pour les membranes actives, nous verrons d'abord les résultats sur des membranes passives qui nous ont permis de tester notre technique de détection et d'analyse. Ensuite nous discuterons les premiers résultats qui ont été obtenus sur des membranes actives contenant la bactériorhodopsine. Enfin, nous présenterons une autre application de notre technique à l'étude de membranes hors-équilibre en présence d'apport de lipides.

Première partie

Introduction

Chapitre I.1

Les vésicules géantes à l'équilibre et hors-équilibre



CE CHAPITRE va nous permettre de donner un aperçu de la physique des membranes et en particulier vésicules géantes. Toutefois il ne vise pas à présenter une revue complète sur le sujet, mais à donner les rappels les plus importants sur ce sujet ainsi que quelques exemples de leurs propriétés et applications.

En premier lieu nous aborderons les vésicules géantes comme arrangement particulier de molécules amphiphiles dans l'eau, puis nous nous intéresserons aux propriétés physico-chimiques des vésicules lipidiques, nous présenterons les ordres de grandeurs des divers paramètres caractéristiques, ainsi que les théories permettant leur modélisation, nous rappellerons ensuite les différentes techniques utilisées pour étudier les vésicules géantes lipidiques, puis enfin quelques applications de ces vésicules.

Pour une revue des propriétés physiques des vésicules lipidiques géantes, on pourra se reporter à [Seifert, 1997].

A. De la molécule amphiphile à la vésicule

Les molécules amphiphiles réunissent en un seul édifice moléculaire une zone hydrophile et une zone hydrophobe. Cette caractéristique particulière leur confère un comportement tout-à-fait spécifique lorsqu'on les met en solution. En effet, ces molécules, pour résoudre la frustration liée aux deux zones présentes dans la molécule, vont dans un premier temps se mettre aux interfaces, comme par exemple l'interface eau-air, avec bien entendu la partie hydrophile du côté de l'eau et la partie hydrophobe du côté de l'air ou du milieu non aqueux. Si on augmente la concentration jusqu'à saturer l'interface de molécules amphiphiles, des molécules vont rester en solution individuellement, mais cela est très coûteux en énergie libre à cause de la partie hydrophobe exposée à l'eau. Ainsi les molécules vont s'auto-organiser et former des assemblages qui leur permettront de protéger leurs parties hydrophobes de l'eau. Le caractère amphiphile de la molécule va donner ainsi naissance à de

nombreuses phases de diverses morphologies. [Israelachvili, 1992, chapitre 16].

A.1 La vésicule, une phase particulière des lipides dans l'eau

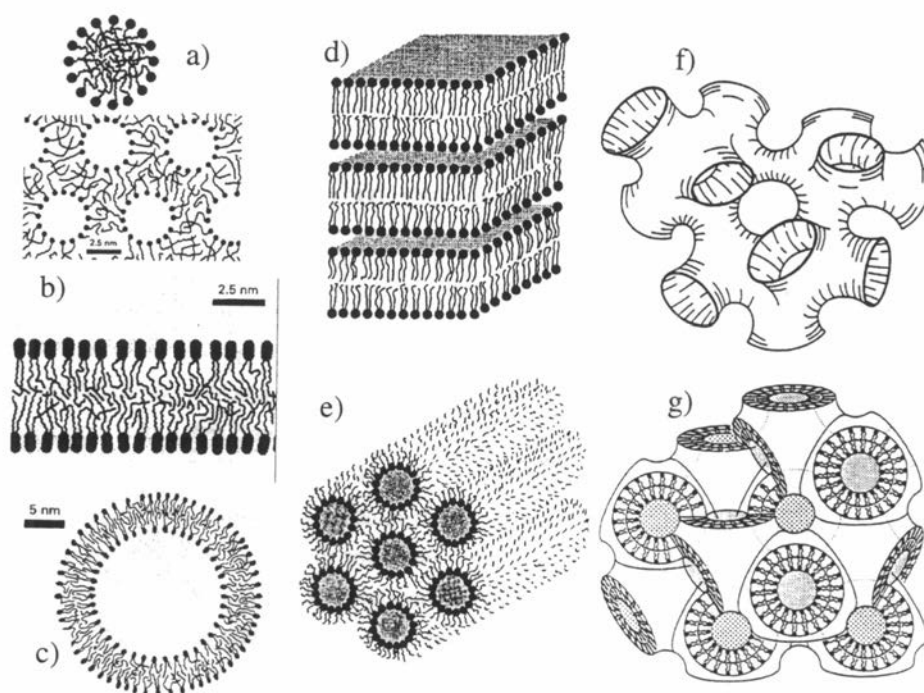


FIG. I.1 – *Quelques exemples de phases possibles pour des molécule amphiphiles dans l'eau (conventionnellement les points représentent la partie hydrophile et les queues la partie hydrophobe). (a) Micelle et micelle inverse, (b) bicouche, (c) Vésicule, (d) Phase lamellaire (empilement de bicouches), (e) Phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), (f) phase éponge, (g) phase cubique inverse bicontinue. D'après [Israelachvili, 1992; Lipowsky and Sackmann, 1995a].*

On peut voir sur la fig. I.1 les différents types d'assemblages que peuvent former les molécules amphiphiles pour concilier le contact des parties hydrophiles avec l'eau et empêcher celui des parties hydrophobes [Lipowsky and Sackmann, 1995a, Chapitre 3]. Les lipides sont une catégorie particulière d'amphiphiles possédant une tête polaire, donc hydrophile, qui peut être chargée ou non, et une ou plusieurs chaînes aliphatiques, hydrophobes (voir fig. I.2). Les lipides qui nous intéresseront dans la suite de ce travail sont les dialkylphosphatidylcholines, formés autour d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un groupe phosphocholine (en position α). Les lysolipides sont quant à eux des lipides de même architecture mais ne comportant qu'un seul acide gras, et donc laissant une fonction alcool à la molécule de glycérol d'origine.

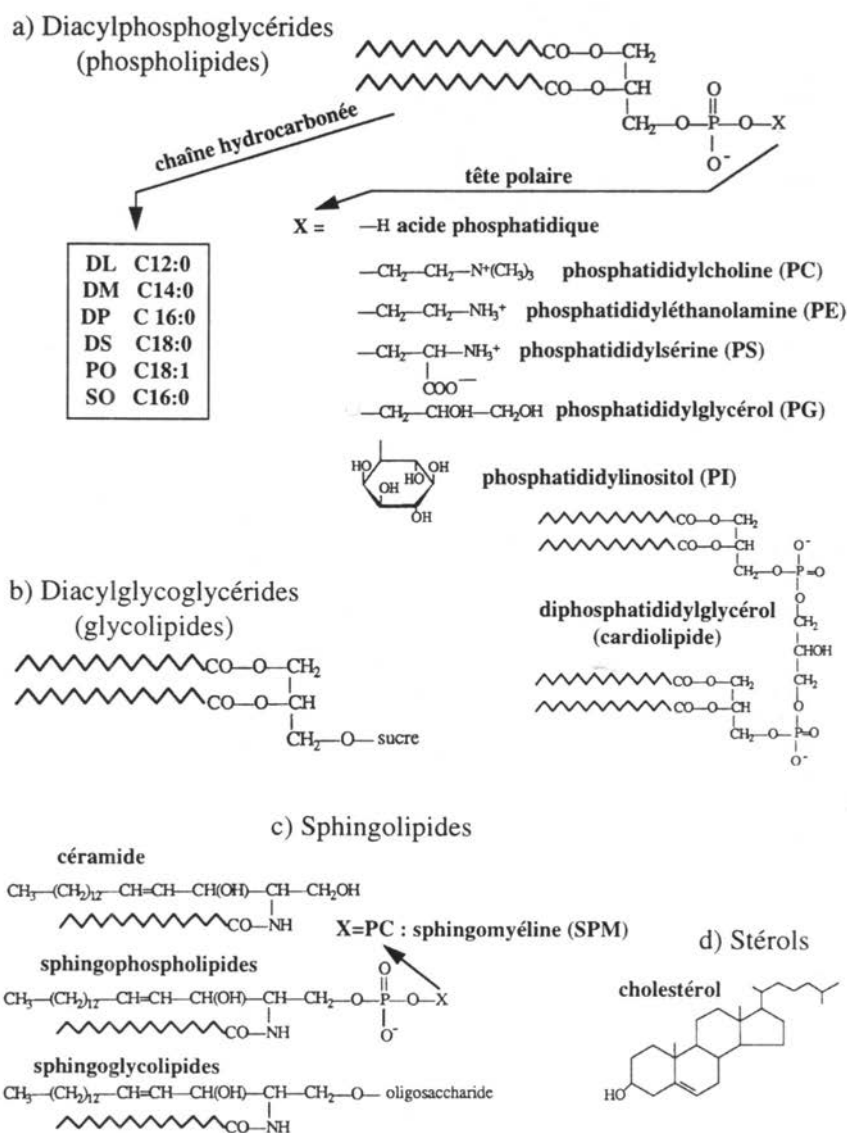


FIG. I.2 – Quelques familles de lipides : (a) phosphoglycériques (phospholipides) ; (b) Diacylglycoglycérides (glycolipides) ; (c) Sphingolipides ; (d) Stérols. Par ailleurs on remarquera la notation classique Cn:m qui désigne une chaîne aliphatique de n carbones contenant m insaturations, d'après [Shechter, 1993].

Suivant les conditions de température, de concentration ou de salinité, les assemblages supramoléculaires peuvent former des phases de type cristal liquide. En particulier pour les lipides on peut observer des phases lamellaires plus ou moins ordonnées (L_α , P_β , ou L_β). Nous ne détaillerons pas ces points ici (On pourra se reporter pour plus de détails à [Lipowsky and Sackmann, 1995a, Chapitre 3] et [Israelachvili, 1992, Chapitre 17]). Nous nous bornerons ici à donner à titre d'exemple le diagramme de phase du DMPC (voir fig. I.3).

Une autre caractéristique importante de l'amphiphile qui va conditionner l'ar-

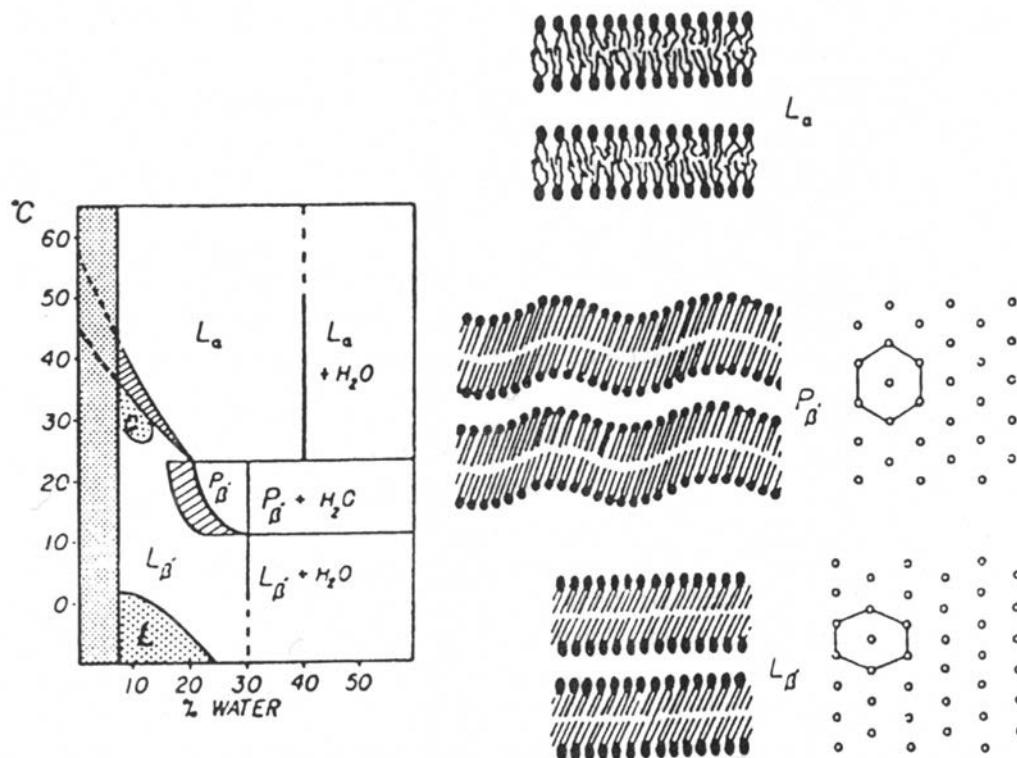


FIG. I.3 – Diagramme de phase du DMPC dans l'eau (à gauche), avec représentée schématiquement l'organisation des lipides dans chaque type de phase (à droite) (d'après [Seifert, 1997]).

rangement qui sera adopté est la forme intrinsèque de la molécule ; la taille respective des parties hydrophile et hydrophobe va déterminer aussi le type de phase qui sera formée. On pourra se reporter à la fig. I.4 pour un récapitulatif.

Un type particulier d'assemblage va nous intéresser au cours de ce travail : la bicouche lipidique et en particulier les cas où elle est refermée sur elle-même formant alors une vésicule. Là encore, une grande variété de tailles et de formes sont possibles. Une bicouche est formée de deux feuillets parallèles où les têtes sont au contact avec de l'eau et les chaînes forment un cœur hydrophobe protégé de l'eau (voir les bicouches dans la fig. I.4). Dans un premier temps, nous distinguerons les vésicules constituées par une seule bicouche, appelées unilamellaires, et les vésicules multilamellaires en comportant un nombre plus grand. Parmi les vésicules unilamellaires, il est classique de distinguer trois domaines de taille : Les *Small Unilamellar Vesicles*

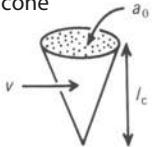
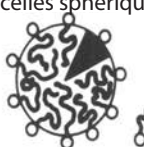
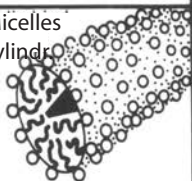
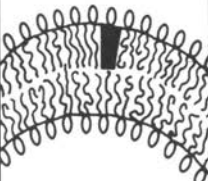
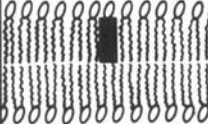
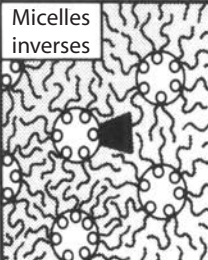
Lipides	Paramètre critique d'empilement	Forme critique d'empilement	Structures formées
Lipides à une seule chaîne (lysolipides) avec une grosse tête (LysoPC par exemple)	$< 1/3$	cône 	Micelles sphériques 
Lipides à une seule chaîne (lysolipides) avec une petite tête (LysoPG par exemple)	$1/3-1/2$	cône tronqué 	Micelles cylindriques 
Lipides à double chaîne avec une grosse tête (diacyl-PC, -PE, -PS, -PG, -PI, -PA, sphingolipides, DGDG)	$1/2-1$	cône tronqué 	Bicouches de vésicule 
Lipides à double chaîne avec une petite tête (Diacyl-PE, -PS en présence d'ions calcium)	~ 1	cylindre 	Bicouches planes 
Lipides à double chaîne avec des insaturations, et une petite tête (Diacyl-PE en présence d'ions calcium, DMDG)	> 1	cône tronqué inversé 	Micelles inverses 

FIG. I.4 – Différentes structures obtenues en fonction de la forme des lipides. Le paramètre important est le rapport $\frac{v}{a_0 l_c}$ (d'après [Israelachvili, 1992]).

(SUV), ayant des tailles de 40 à 100 nm, les *Large Unilamellar Vesicle* (LUVs) avec des tailles allant de 100 à 500 nm et enfin les *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) dont les tailles vont de 0.5 à 100 μm . Les GUVs sont les seules à pouvoir être observées optiquement et feront l'objet de notre étude. Elle peuvent avoir des formes très diverses, comme on peut le voir fig. I.5. On verra au § B.1.4 p. 14 que ces formes peuvent être décrites par un diagramme de phase que nous détaillerons plus loin. Enfin, il faut noter que nous travaillerons ici uniquement avec des vésicules où la bicouche lipidique est dans la phase liquide. En effet, pour les lipides, il existe une température de transition entre une phase gel et une phase liquide à une température qui dépend de la nature des lipides (voir pour un exemple fig. I.6 p. 10). Nous nous placerons systématiquement à une température nettement supérieure à la température de transition afin de s'affranchir des effets prétransitionnels (voir par exemple [Dimova et al., 2000]). Notons aussi que la présence d'une protéine dans la membrane, et son fonctionnement dans le cas de protéines membranaires de types pompes ou canaux peut modifier la température de transition [Koltover et al., 1999].

B. Propriétés physico-chimiques des vésicules géantes

B.1 Modélisation physique de la vésicule

La bicouche lipidique est formée de deux feuillets, avec une épaisseur totale de 5 à 7 nm. Les molécules de lipide occupent une aire par molécule de l'ordre de 0.4 nm^2 , avec une distance de 0.5 nm entre les molécules [Lipowsky and Sackmann, 1995a]. Nous allons ici décrire dans un premier temps les degrés de liberté liés à l'aspect fluide de la membrane, puis les différents modes de déformation de la membrane.

B.1.1 Une membrane fluide à l'échelle microscopique

Nous nous intéressons à une membrane qui a les propriétés d'un fluide bidimensionnel formé de deux feuillets. On peut donc distinguer les mouvements des molécules par diffusion latérale, par diffusion rotationnelle et par passage d'un feuillet à l'autre (voir figure I.7 p. 10) .

Diffusion latérale et rotationnelle Les molécules de lipide peuvent diffuser librement dans la bicouche ; un coefficient de diffusion a été mesuré par diverses techniques, et sa valeur est de l'ordre de $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ (mesure par la *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 305]), la valeur précise dépendant bien entendu du type de lipide. Lorsqu'en abaissant la température on provoque une transition vers une phase de type cristal liquide, ce coefficient chute à une valeur typique de $D = 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ [Shechter, 1993, p. 123].

Par ailleurs, une rotation des molécules de lipide sur elles-mêmes est aussi possible. Pour ce degré de liberté, on a un coefficient de diffusion (dit rotationnel) de

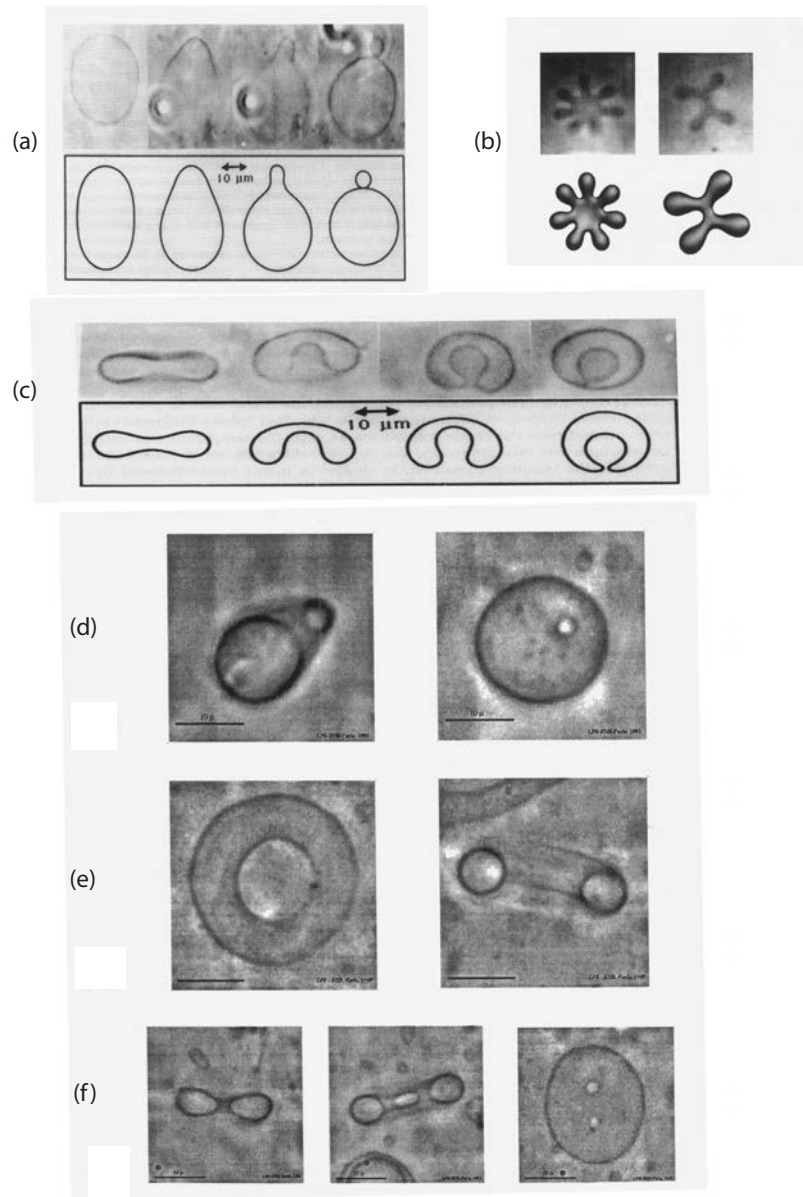


FIG. I.5 – *Différentes formes de vésicules: (a) une transition de bourgeonnement (budding) provoquée par une élévation de température depuis une vésicule de forme prolate; (b) vésicule en forme d'étoile de mer (starfish); (c) une transition depuis une forme oblate vers un stomatocyte provoquée par une élévation de la température. Il existe aussi de nombreuses forme de topologie plus complexe, telle (d) des tores non axisymétriques, (e) des tores axisymétriques, (f) une vésicule de topologie plus élevée en forme de bouton d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995a, Chapitre 8] et [Döbereiner, 1999]*

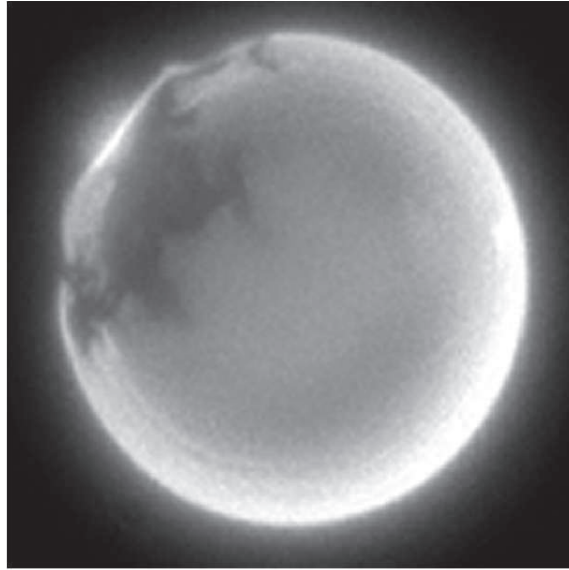


FIG. I.6 – Image d’une vésicule contenant deux phases : une phase gel (phase sombre), et une phase liquide (phase fluorescente). On remarquera que la phase gel est crevassée. La composition de la vésicule est en masse 50 % de Sphingomyeline, 50 % de DOPC (d’après [Roux, 2003]).

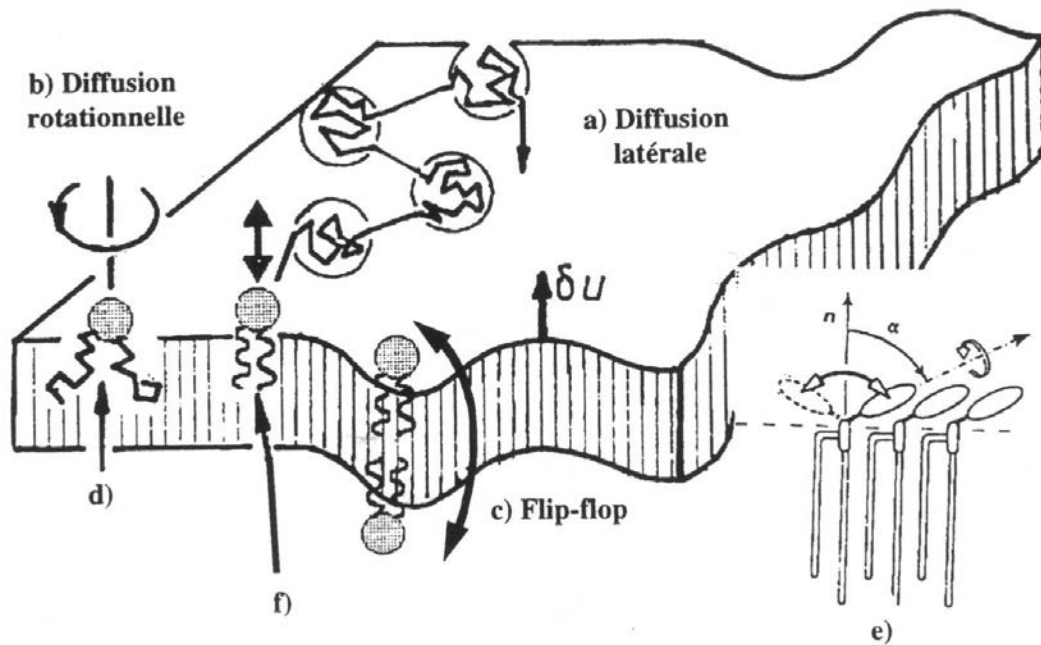


FIG. I.7 – Principaux degrés de liberté d’un lipide dans une bicouche. (a) diffusion latérale; (b) diffusion rotationnelle; (c) flip-flop; (d) mouvement des chaînes aliphatiques; (e) mouvement des têtes polaires; (f) mouvement de vibration hors du plan de la membrane. (d’après [Lipowsky and Sackmann, 1995a])

l'ordre de $D_r = 10^8 \text{ s}^{-1}$ [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 239]

Flip-flop Enfin, la possibilité existe pour les lipides de passer d'une bicouche à l'autre (ce qu'on désigne par le terme anglais *flip-flop*). Néanmoins c'est un phénomène qui reste lent car il est très défavorable de faire passer la tête polaire des lipides à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queue des lipides. On a un coefficient de diffusion de l'ordre de $D_f = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ [Alberts et al., 1989, pp. 278-279]. Il faut noter que ce passage d'un feuillet à l'autre a bien lieu dans les membranes biologiques. En effet des enzymes, les flipases sont capables de favoriser fortement ce mouvement [Alberts et al., 1989, p. 449]

B.1.2 La membrane à l'échelle macroscopique : un milieu continu

Plaçons-nous maintenant à plus grande échelle. On peut alors considérer la membrane comme un milieu continu puisque les distances observées sont grandes devant la taille des molécules.

Dans l'énergie élastique vont entrer plusieurs modes de déformation : un terme d'extension-compression de la membrane, un terme lié à la courbure, ainsi qu'un terme de cisaillement. Ensuite nous examinerons le fait que la membrane est composée de deux feuillets, et les conséquences pour l'énergie élastique.

B.1.3 Premières théories sur l'énergie élastique d'une membrane

Elles ont été proposées par Canham et Helfrich indépendamment [Canham, 1970; Helfrich, 1973a]. On pourra se reporter à la fig. I.8 pour une illustration des différentes déformations.

La première déformation est l'extension-compression, dont l'énergie $\mathcal{H}_{ext}$ peut-être mise sous la forme

$$\mathcal{H}_{ext} = \frac{1}{2} \chi_{ce} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (\text{I.1.1})$$

et dépend quadratiquement de l'augmentation ou de la diminution relative de surface. Cette déformation est très limitée pour les bicouches lipidiques (1 à 2 %). En effet au delà d'une tension critique de lyse (environ 10^{-3} N/m), un pore s'ouvre irréversiblement et la vésicule est détruite. χ_{ce} est de l'ordre de 0.2 N/m pour des membranes lipidiques [Evans and Rawicz, 1990].

Dans le cas où la membrane n'est pas en phase liquide mais en phase cristal liquide ou polymérisée, alors un terme de cisaillement doit être pris en compte. Si μ_{cis} est le module de cisaillement, λ le taux d'extension latérale ($\lambda = \frac{L_0 + \Delta L}{L_0}$), alors l'énergie due au cisaillement prend la forme [Sackmann, 1989] :

$$\mathcal{H}_{cis} = \frac{1}{2} \mu (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (\text{I.1.2})$$

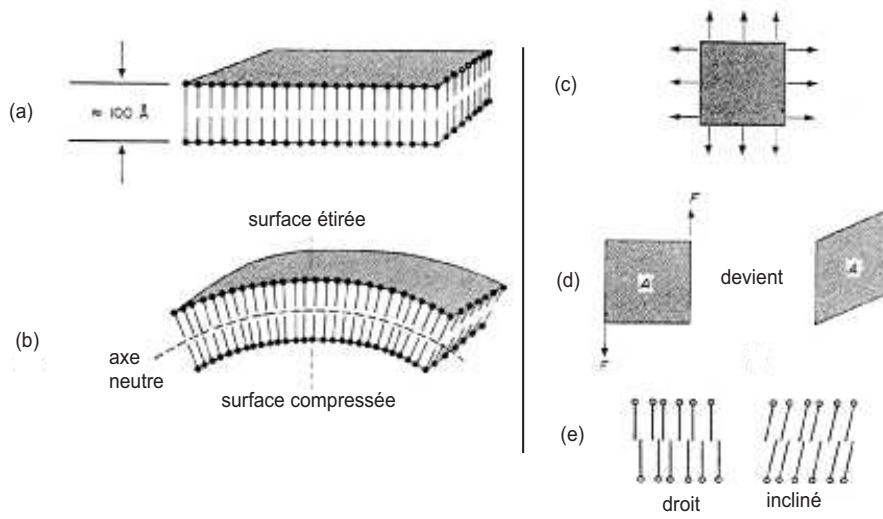


FIG. I.8 – Différents modes de déformation d'une membrane pris en compte dans le hamiltonien de Canham-Helfrich. (a) Une vue schématique de la membrane d'une vésicule; (b) Courbure de la membrane; (c) Extension/Compression de la membrane; (d) cisaillement (valable pour les membranes polymérisées ou en phase gel uniquement); (e) inclinaison des molécules (d'après [Canham, 1970; Helfrich, 1973a])

Un terme d'inclinaison des molécules est aussi rajouté par Helfrich, nous le donnons ici pour mémoire, mais nous le négligerons par la suite car il n'intervient que pour certaines phases cristal liquide (par exemple $P_{\beta'}$). Si $\mathbf{n}$ désigne le vecteur unitaire normal à la membrane localement, et $\mathbf{d}$ le vecteur unitaire correspondant à la direction moyenne des molécules^a, si on note k_t le module de rigidité élastique d'inclinaison, alors on peut écrire le terme d'énergie comme

$$\mathcal{H}_{incl} = \frac{1}{2} k_t (\mathbf{n} \wedge \mathbf{d})^2 \quad (\text{I.1.3})$$

Enfin, il faut encore compléter cette énergie par le terme dû à la courbure de la membrane; là encore, c'est des théories d'élasticité de cristaux liquides qu'est venu ce terme. On montre que la manière la plus générale d'écrire l'élasticité de courbure, à partir d'une forme quadratique est équivalente à la forme

$$\mathcal{H}_{courb} = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \frac{1}{2} \kappa_G c_1 c_2 \quad (\text{I.1.4})$$

où κ est le module de rigidité de courbure, κ_G est le module de rigidité de courbure gaussienne, et c_1 et c_2 les deux courbures principales de la membrane, c_0 la courbure spontanée. Cette dernière rend compte de la courbure la plus adéquate à la forme des lipides (voir § I.4 p. 7). Le théorème de Gauss-Bonnet montre que le

a. Ce vecteur correspond au vecteur directeur dans la théorie de l'élasticité des cristaux liquides de Frank.

Matériau	Module de cisaillement μ_{cis} (J/m ²)	Module de compressibilité χ_{ce} (J/m ²)	Module de rigidité de courbure κ (J)
Laiton	110	100	10^{-15}
Polyéthylène	5	5	5×10^{-17}
Caoutchouc	0.05	0.06	5×10^{-20}
Globule rouge	6×10^{-6}	-	7×10^{-20}
Vésicule de DMPC	0	0.145	1.2×10^{-19}

TAB. I.1 – *Modules élastiques de quelques matériaux d'après [Sackmann, 1989]. Prenant l'épaisseur d'une membrane h (supposée fixe) et connaissant le module de compressibilité volumique G , on a $\chi_{ec} = hG$, de même à partir du module élastique E , on a $\kappa = Eh^3/12(1 - \nu_p^2)$ où ν_p est le rapport de Poisson, et $\mu_{cis} = Eh/2(1 + \nu_p)$ [Landau and Lifschitz, 2000]*

produit des deux courbures principales intégré sur la vésicule est un invariant topologique ; par conséquent, lorsque les vésicules ne changent pas de topologie (pas de formation de poignée), nous omettrons le terme de courbure gaussienne.

La tension de la membrane a plusieurs origines : une enthalpique $\sigma = \frac{\partial F}{\partial A}$ et comme nous le verrons plus loin, une entropique. Lorsqu'on tire sur la membrane, on peut la mettre sous tension, et l'énergie libre F de la membrane va varier avec l'augmentation d'aire visible au microscope ΔA_p . L'aire microscopique de la membrane reste fixe^b et donc il peut ne pas y avoir de contribution du terme d'étirement-compression. On va ainsi retrouver la définition classique de la tension de surface, $\sigma = \partial F / \partial A$, et on aura le terme d'énergie

$$\mathcal{H}_{tens} = \sigma \frac{\Delta A_p}{A} \quad (\text{I.1.5})$$

On va discuter plus loin de la signification précise de ce terme.

On va finalement pouvoir écrire l'énergie d'une vésicule, dans le régime où on n'étire pas la membrane et où donc l'énergie d'étirement ne jouera pas de rôle, en négligeant les termes d'inclinaison et de cisaillement comme

$$H = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0) + \sigma \frac{\Delta A}{A} \right] dS \quad (\text{I.1.6})$$

connu sous le nom de Halmiltonien de Canham-Helfrich.

On pourra se reporter au tableau I.1 pour se rendre compte des ordre de grandeur en jeu. Pour une revue on pourra se reporter à [Sackmann, 1989; Duwe et al., 1989].

^b. En effet on ne fait que déplier le froissage submicroscopique de la membrane, et donc seule l'aire visible au microscope varie.

B.1.4 Vers le modèle ADE

Il reste un aspect microscopique qui n'est pas pris en compte dans les termes de l'énergie élastique : le fait que la membrane soit composée de deux feuillets de lipides. Il est possible d'écrire un terme de friction entre les deux feuillets : il relie la force par unité de surface Σ due à la friction à la vitesse d'une membrane par rapport à l'autre et à un coefficient b_s , par la formule :

$$\Sigma \equiv b_s \mathbf{v} \quad (\text{I.1.7})$$

d'après [Evans and Sackmann, 1988] et [Merkel et al., 1989; Yeung and Evans, 1995; Pott and Méléard, 2002]. Dans ce dernier article on trouve une estimation de b_s pour SOPC de 10^{-8} N.s/m^3 .

De plus, le nombre de lipides sur les feuillets externe et interne peut être différent, ce qui peut induire une courbure de la membrane. Dans un premier temps, s'est développé le modèle dit *bilayer coupling*, où le nombre de lipides sur chaque feuillet est considéré comme constant mais peut être différent [Svetina, 1982; Svetina and Zeks, 1983; Svetina and Zeks, 1985; Svetina and Zeks, 1989]. Cette contrainte est ajoutée, et l'énergie de courbure est calculée par le hamiltonien de Canham-Helfrich. Par la suite, il va être attribué une énergie à cette courbure globale issue de la dissymétrie du nombre de lipides entre le feuillet extérieur et le feuillet intérieur, sous la forme^c :

$$H_{cg} = \bar{\kappa} \frac{\pi}{AD^2} (\Delta A^f - \Delta A_0^f)^2 \quad (\text{I.1.8})$$

où $\bar{\kappa}$ est le module de rigidité de courbure globale, A la surface de la membrane (prise au centre de la bicouche), D est la distance entre le milieu des deux feuillets, et $\Delta A^f = A^{out} - A^{in}$ est la différence d'aire entre le feuillet externe et le feuillet interne adoptée par la vésicule, alors que cette ΔA_0^f indique la différence d'aire due strictement à la différence de nombre de lipides. Si on ajoute à ce terme le hamiltonien de Canham-Helfrich, on obtient le modèle ADE (*Area Difference Elasticity*) [Miao et al., 1994]. Dans une première version, la courbure spontanée des lipides n'a pas été intégrée dans ce modèle. Ce modèle a ensuite été étendu aux LUVs [Mui et al., 1995], puis a pris en compte la courbure spontanée qui est une propriété intrinsèque des lipides (voir § B.3 p. 23), et est bien distincte de la courbure globale due à une asymétrie du nombre ou de la nature des lipides [Seifert, 1997].

On pourra consulter le tableau I.2 pour un résumé des caractéristiques de chaque modèle. D'autres termes ont été proposés pour rendre compte de situations particulières (par exemple la formation et la stabilité de micro- et nanotubes [Kralj-Iglic et al., 2002]).

B.1.5 La tension

Il existe plusieurs moyen de déduire de la théorie le terme de tension ; un premier est de considérer la tension comme effective en tant que multiplicateur de Lagrange

c. Notons qu'il s'agit là d'une énergie pour toute la vésicule (comme le symbolise la lettre droite) et non d'un terme local (noté ici en lettre calligraphiée) qu'il faut intégrer sur la surface de la vésicule.

Modèle	énergie	Variable fixée
minimal	$\kappa \frac{1}{2} \oint dA (c_1 + c_2)^2$	A, V
BC	$\kappa \frac{1}{2} \oint dA (c_1 + c_2)^2$	A, V, M
ADE	$\kappa \frac{1}{2} \oint dA (c_1 + c_2)^2 + \bar{\kappa} \frac{\pi}{A} (M - M_0)$	A, V
SC	$\kappa \frac{1}{2} \oint dA (c_1 + c_2 - c_0)^2$	A, V
ADE-SC	$\kappa \frac{1}{2} \oint dA (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} \frac{\pi}{AD^2} \oint dA (c_1 + c_2)$	A, V

TAB. I.2 – Principaux modèles pour rendre compte de l'élasticité de courbure d'une membrane; Modèle minimal, Bilayer Coupling(BC), Area Difference Elasticity(ADE), Spontaneous Curvature(SC). A désigne l'aire de la vésicule et V son volume, $M = \frac{\Delta A^f}{2D}$ et $M = \frac{\Delta A_0^f}{2D}$. Les termes de tension et de courbure gaussienne ont volontairement été omis (d'après [Seifert, 1997]).

de la contrainte d'aire fixée. C'est ainsi que la tension est introduite dans [Seifert, 1995].

D'autres auteurs ont développé d'autres méthodes faisant appel à des approches microscopiques afin de déduire le terme de tension. C'est ainsi que Helfrich développa son «modèle de pointes» [Helfrich, 1989].

Dans [Fournier et al., 2001], les auteurs proposent une autre origine à la tension ; en effet, dans les expériences telles que celles classiques de micropipettes [Evans and Rawicz, 1990; Rawicz et al., 2000], on considère le nombre de lipides fixé ; en l'occurrence ce n'est pas l'aire visible au microscope mais bien l'aire microscopique qui est fixée, alors que l'aire résolue à l'échelle optique est variable. C'est sur ce point que se basent les auteurs pour faire apparaître une tension due uniquement à un *coarse-graining* lié à la résolution finie du microscope. La tension devient donc la variable intensive associée à l'aire A_p qui est visible par le microscope optique, et non plus à l'aire réelle (voir fig. I.11 p. 17) ; cela permet donc d'envisager une membrane sous tension avec néanmoins une aire réelle fixée [Peliti and Leibler, 1985]. On trouve alors le terme suivant dans le hamiltonien pour une membrane étirée mécaniquement :

$$H_s(A_p) \simeq \frac{1}{2} k_{eff} L^2 \left(\frac{A_p - A^*}{L^2} \right)^2 \quad \text{avec} \quad k_{eff} = \frac{8\pi\kappa^2\Lambda^2}{kT} \quad (\text{I.1.9})$$

qui est bien similaire au terme de tension introduit précédemment. De plus la relation qui relie maintenant la tension à l'excès d'aire déduite par ces auteurs est en tout point similaire à l'eq. I.1.16 p. 18 que nous allons déduire de la définition de la tension que nous allons donner :

$$\sigma \simeq \sigma_0 \exp \left(\frac{8\pi\kappa}{kT} \alpha \right) \quad \text{avec} \quad \sigma_0 \simeq \kappa \Lambda_0^2 \exp \left(-\frac{8\pi\kappa}{kT} \alpha_m \right) \quad (\text{I.1.10})$$

où dans la configuration d'une membrane de plane dans un cadre carré de côté L , A_p est l'aire visible optiquement, Λ est le vecteur d'onde de coupure par le système

optique (les fluctuations de vecteur d'onde inférieur à Λ sont visibles en tant que telles et les fluctuations de vecteur d'onde supérieur à Λ sont lissées par le système optique), Λ_0 un vecteur d'onde de coupure moléculaire, α_m l'excès d'aire microscopique, et A^* l'aire visible optiquement dans la configuration de moindre énergie (voir [Fournier et al., 2001]).

B.2 Conséquences physiques

B.2.1 Spectre de fluctuations, excès d'aire

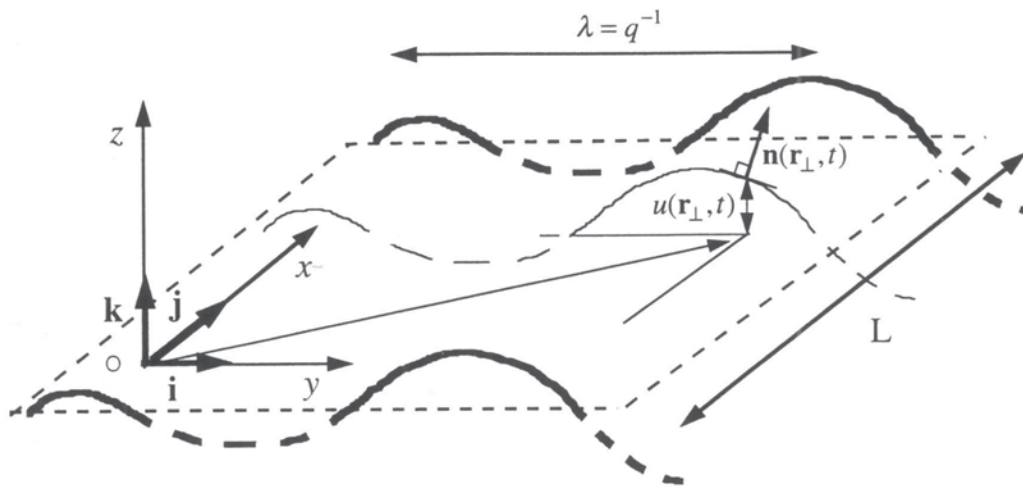


FIG. I.9 – Représentation schématique d'une membrane plane soumise à des fluctuations avec les coordonnées et variables géométriques que nous utiliserons (d'après [Manneville, 1999]).

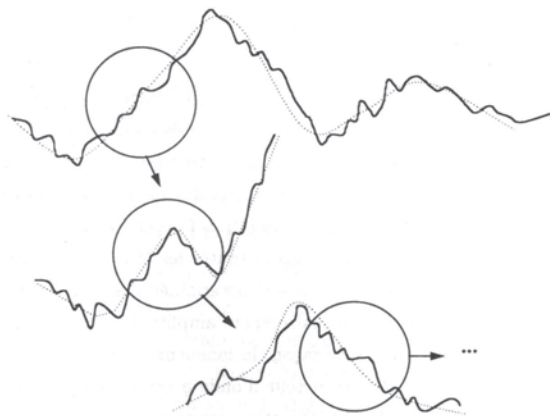


FIG. I.10 – Schéma d'une membrane fluctuante, froissée à toutes les échelles (d'après [Manneville, 1999]).

Les vésicules lipidiques ont une tension très faible comparée à d'autres systèmes interfaciaux ; en effet elle est de l'ordre de $10^{-5} - 10^{-8} \text{N/m}$ (comparée par exemple à la tension de surface de l'eau qui est $72 \times 10^{-3} \text{N/m}$), ce qui a pour conséquence qu'on se trouve dans un régime où l'énergie de courbure domine. Par conséquent la membrane est froissée par des fluctuations à toutes les échelles de longueur (voir fig. I.10). La première preuve expérimentale est venue du scintillement des globules rouges, interprété pour la première fois en terme de fluctuations dans [Brochard and Lennon, 1975].

La surface étant froissée à toutes les échelles, cela implique qu'une partie de l'aire est stockée dans ces fluctuations, à des échelles sub-optiques. On peut donc espérer «déplier» ces fluctuations en mettant la vésicule sous tension. En effet, si on considère une membrane plane fluctuante (voir schéma fig. I.9), désignons par $\mathbf{r}_\perp$ les coordonnées d'un point du plan (xOy), alors on peut associer à ce point la fonction $u(\mathbf{r}_\perp)$ donnant la position de la membrane suivant l'axe z normal au plan représentant la position moyenne de la membrane. Suivant [Helfrich and Servuss, 1984], on peut écrire que si nous distinguons l'aire projetée A_p et l'aire réelle de la membrane A (voir schéma fig. I.11) :

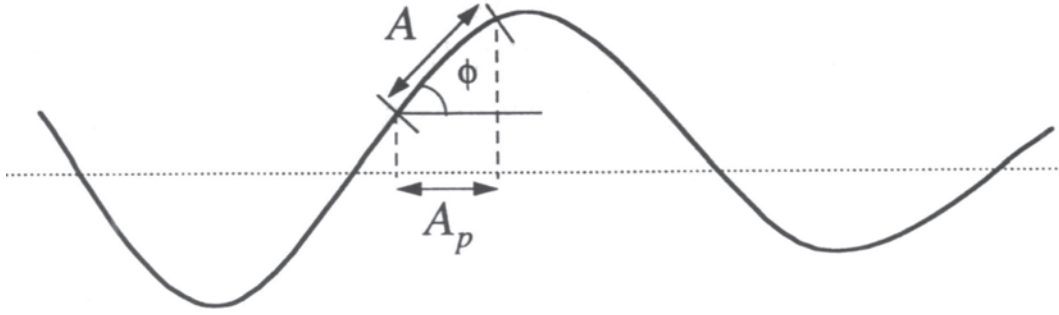


FIG. I.11 – Schéma indiquant l'aire réelle de la membrane et l'aire projetée, dans le cas d'une membrane fluctuante (d'après [Manneville, 1999])

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{A - A_p}{A} = 1 - \cos \phi \simeq \frac{\phi^2}{2} \simeq \frac{(\nabla u)^2}{2} \quad (\text{I.1.11})$$

Le Hamiltonien de Canham-Helfrich peut alors s'écrire sous la forme

$$H = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 \right] dS \quad (\text{I.1.12})$$

avec la transformation de Fourier suivante

$$u(\mathbf{q}_\perp, t) = \frac{1}{\sqrt{A}} \iint u((\mathbf{r})_\perp, t) \exp(i\mathbf{q}_\perp \mathbf{r}_\perp) d^2 \mathbf{r}_\perp \quad (\text{I.1.13})$$

A l'aide du théorème d'équipartition il vient immédiatement le spectre de fluctuation :

$$\langle u(q_\perp)^2 \rangle = \frac{k_b T}{\sigma q_\perp^2 + \kappa q_\perp^4} \quad (\text{I.1.14})$$

Il est à noter que ce spectre peut aussi être obtenu via les équations hydrodynamiques du système comme on peut le trouver repris par exemple dans [Manneville, 1999, pp. 20-24].

On peut alors calculer l'excès de surface :

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A} = \frac{k_b T}{8\pi\kappa} \ln \frac{\pi^2/a^2 + \sigma/\kappa}{\pi^2/L^2 + \sigma/\kappa} \quad (\text{I.1.15})$$

où a est un *cut-off* microscopique et L la taille de la membrane. En remarquant qu'en général $\pi^2/L^2 \ll \frac{\sigma}{\kappa} \ll \pi^2/a^2$, on peut retrouver la relation vérifiée plus tard par les expériences de micropipette par E. Evans [Evans and Rawicz, 1990], entre $\Delta\alpha$ l'écart de l'excès de surface par rapport à un état de référence et le rapport entre la tension σ sur la tension dans l'état de référence σ_0 :

$$\Delta\alpha = \frac{k_b T}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma}{\sigma_0} \quad (\text{I.1.16})$$

Expérimentalement, l'aire contenue dans le froissage a ainsi pu être mesurée.

Enfin, le calcul en géométrie sphérique du spectre de fluctuations a été fait dans [Milner and Safran, 1987] et conduit au spectre

$$\langle |u_{lm}|^2 \rangle = \frac{k_b T}{\kappa} \left\{ (l+2)(l-1) [l(l+1) - 4w_s + 2w_s^2 - \tilde{\sigma}] \right\}^{-1} \quad (\text{I.1.17})$$

avec $w_s = r/r_0$ avec r le rayon de la vésicule et r_0 le rayon de courbure spontanée, $\tilde{\sigma} = \sigma r^2/\kappa$ la tension adimensionnelle (σ la tension). u_{lm} est l'amplitude du rayon dans le développement en harmonique sphérique :

$$r(\theta, \phi) = r_0 \left[1 + \sum_{l,m} u_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi) \right] \quad (\text{I.1.18})$$

C'est sur ces bases que se firent ensuite les premières analyses de contours de vésicules géantes utilisant la projection sur les harmoniques sphériques [Faucon et al., 1989; Duwe et al., 1990] [Mitov et al., 1992].

B.2.2 Formes des vésicules

Diverses formes de vésicules ont été observées expérimentalement et il n'est pas possible d'en rendre compte par des théorie basée sur le seul hamiltonien de Canham-Helfrich uniquement. Divers modèles dans un premier temps concurrents ont été proposés tenant compte de la courbure spontanée ou fixant la différence d'aire entre les deux feuillets [Berndl et al., 1990; Lipowsky, 1991; Lipowsky, 1995; Seifert et al., 1991]. Ces approches se sont finalement combinées pour donner le modèle ADE. Par ailleurs il s'agissait aussi de décrire les transitions de phase entre ces différentes formes.

Vésicules de même topologie que la sphère Le modèle ADE offre la possibilité de déduire un diagramme de phase des vésicules en fonction de trois paramètres simples, le rapport $\alpha = \bar{\kappa}/\kappa$ entre le module de rigidité de courbure global $\bar{\kappa}$ (voir eq. I.1.8 p. 14) et le module de rigidité de courbure (local) κ , le volume réduit $v = \frac{V}{\frac{4\pi}{3}R_A^3}$ où V est le volume de la vésicule, avec $R_A = \sqrt{\frac{S}{4\pi}}$, et $m_0 = \frac{4\pi\Delta A_0}{2DR_A}$ la différence d'aire réduite entre les deux feuilletts (D est la distance entre les deux feuilletts) [Miao et al., 1994]. Cela a permis d'établir d'un premier diagramme de phase que des travaux suivant ont complété [Döbereiner et al., 1997; Döbereiner et al., 1999; Döbereiner, 2000b]. Il a été intégré la courbure spontanée, qui a été rajoutée au modèle ADE initial; la différence d'aire réduite est alors remplacée par le paramètre $\overline{\Delta a_0} = \frac{\Delta A_0}{8\pi DR_A} + \frac{1}{2\pi\alpha}c_0$. Deux sources de courbure de l'interface interviennent donc : soit une asymétrie du nombre de lipides sur les deux feuilletts (ΔA_0), soit la courbure spontanée (c_0). Ces travaux furent conjointement menés sur le plan théorique et sur le plan expérimental. Cela a permis d'établir un diagramme de phase complet rendant compte des formes *oblate*, *prolate*, étoile de mer, stomatocyte, du bourgeonnement (*budding*) extérieur et du bourgeonnement (*budding*) intérieur. Un tel diagramme est reproduit fig I.12.

On peut encore noter la prévision théorique de vésicules en forme d'étoiles de mer, qui ont été observées expérimentalement [Wintz et al., 1996].

Topologies plus complexes Si la topologie de la vésicule est changée, il faut tenir compte du terme de courbure gaussienne. Le modèle prévoit alors l'existence de vésicules de formes annulaire et stables [Zhong-can, 1990]. Dans le même cadre théorique, Seifert prévoit des vésicules toroïdales [Seifert, 1991] qui ont pu être observées expérimentalement [Fourcade et al., 1992].

Il existe encore d'autres topologies plus complexes observables [Lipowsky and Sackmann, 1995a, Chapitre 8], mais nous n'irons pas plus avant sur ce sujet ; en effet, comme nous allons le voir, ce sont les vésicules de genre 0 qui vont nous intéresser dans cette étude. On pourra trouver une revue dans [Seifert, 1997].

Transition entre formes Les transitions entre les diverses formes se font la plupart du temps par des transitions du premier ordre (voir fig. I.12 et notamment dans le cas du bourgeonnement (*budding*) qui peut aller jusqu'à la fission [Döbereiner et al., 1993; Döbereiner et al., 1997].

Pour se déplacer dans le diagramme de phase on peut faire varier la température [Döbereiner et al., 1997] ; toutefois cela ne modifie que peu la courbure spontanée globale réduite. Pour aller plus loin, différentes méthodes ont été employées : des réactions chimiques [Wick et al., 1996; Petrov et al., 1999], des modifications de soluté [Döbereiner and Seifert, 1996; Döbereiner et al., 1999] ou encore la mise au contact de colloïdes et nanoparticules [Lipowsky and Döbereiner, 1998] capables de modifier ce paramètre afin d'explorer le diagramme de phase dans la direction verticale. Pour une revue plus complète des phénomènes pouvant modifier la courbure

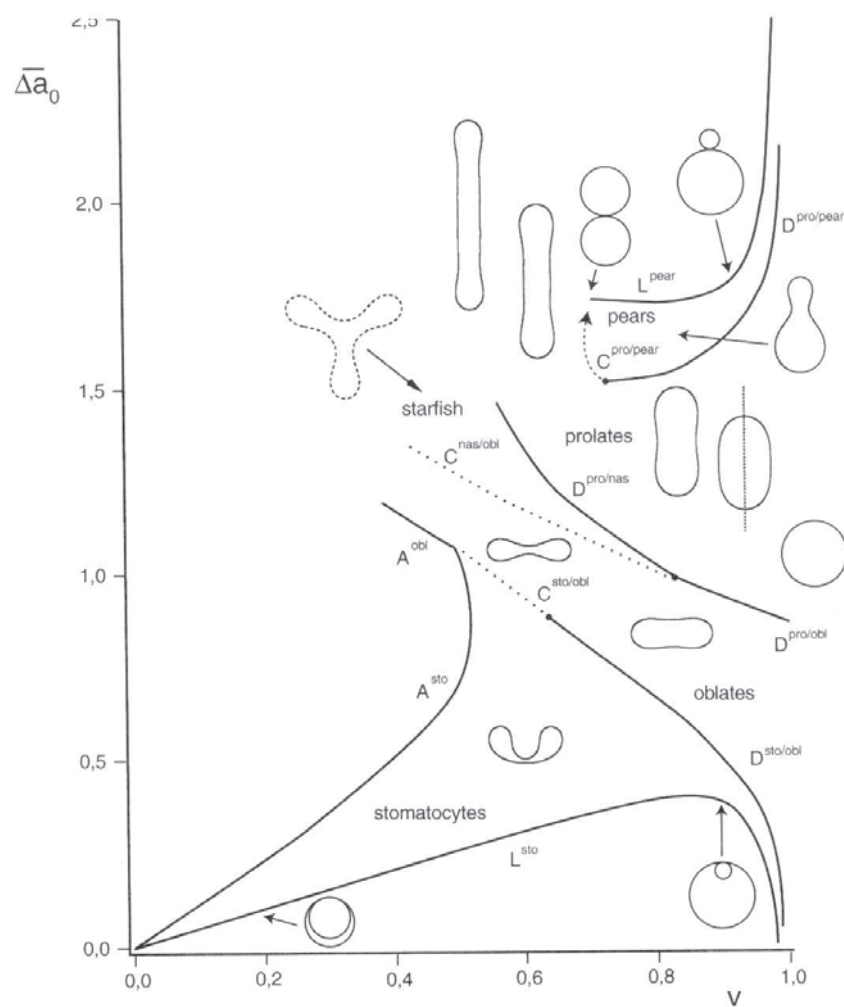


FIG. I.12 – Diagramme de phase des vésicules dans le modèle ADE (d'après [Döbereiner, 2000b])

spontanée, on pourra se reporter à [Döbereiner, 1999, pp. 43 sq.]. Une façon simple est de modifier la solution dans laquelle se trouve les vésicule de diverses manières :

Osmolarité Une des variables sur lesquelles on peut jouer est la différence de pression osmotique entre la solution extérieure et la solution intérieure. On peut ainsi changer le rapport surface/volume et donc modifier le volume réduit. Cela permet de détendre les vésicules si la différence reste faible ou de les «dégonfler» et d'accéder à la perméation pour des différences plus importantes [Boroske and Elwenspoek, 1981]. La différence de pression osmotique permet aussi l'investigation des changements de phase comme la vésiculation et la fission[Döbereiner et al., 1993].

Ions Les interactions avec les ions ont très tôt été mises en évidence. Ainsi si les ions monovalents ont peu d'effet, les ions divalents ou trivalents provoquent souvent des effets importants comme l'adhésion des vésicules entre elles pour former une mousse de vésicule, ou la vésiculation [Lipowsky and Sackmann, 1995a]. En effet les ions interagissent avec la tête polaire du lipide [Akutsu and Seeling, 1981]. Ainsi ils induiront des changements dans la courbure spontanée ainsi que dans le module de rigidité de courbure, donc permettront de jouer sur Δa_0 .

pH La plupart des lipides ont des têtes zwitterioniques ou chargées, on peut donc s'attendre à des modifications du comportement des lipides avec le pH. Ainsi par exemple, la morphologie de GUVs avec des têtes PC va être modifiée vers une vésiculation lorsque le pH augmente, et cette transformation est réversible si on diminue à nouveau le pH [Lee et al., 1999]. L'action est là encore sur Δa_0 .

Asymétrie des solutés Par ailleurs, la différence des solutés entre l'intérieur et l'extérieur va aussi permettre d'agir sur les bicouches, c'est ainsi par exemple qu'on peut, à travers les changement de forme d'une vésicules contenant du raffinose à l'intérieur, plongée dans un mélange de concentration variable de raffinose et de glucose, mesurer que lorsque la proportion de glucose augmente, la courbure spontanée augmente [Döbereiner et al., 1999].

Déformation par gravité Si la masse de la membrane elle-même est négligeable, il est courant d'utiliser des solutés différents à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule pour augmenter le contraste des vésicules au microscope grâce à une différence d'indice. Leurs densités sont en général différentes également et les vésicules tendent à sédimenter (ou à remonter) dans la chambre d'observation, et à être déformées par la gravité. Les corrections de formes dues à la gravité ont été calculées théoriquement dans le modèle *Spontaneous Curvature* dans [Kraus et al., 1995].

En ce qui concerne les vésicules proches de la forme sphérique, un modèle, basé sur le hamiltonien de Canham-Helfrich, à l'aide de la théorie des perturbations a été développé sur les calculs en harmoniques sphériques, et validé expérimentalement dans [Henriksen and Ipsen, 2002]. Les corrections deviennent importantes pour les vésicules de grand rayons. On trouvera plus de détails sur les critères pour prendre en compte la gravité au § A.3.4 p. 172.

Formation de petites vésicules à la surface d'une GUV Comme il est mentionné dans [Boroske and Elwenspoek, 1981], il est courant lors d'un choc osmotique d'observer la présence de petites vésicules à la surface intérieure ou extérieure de la vésicule issue d'un *microbudding*. Nous pensons aussi ici que des vésicules ou d'autres structures (tubes, amas denses,...), y compris à des échelles de longueur non résolues par la microscopie optique se forment lors des chocs osmotique, même relativement faibles. Du *microbudding* est aussi mis en évidence dans [Häckl et al., 1997] dû simplement à un changement de température (et donc à un déplacement dans le diagramme de phase des formes de vésicules); les auteurs notent que ce phénomène est plus marqué pour certains lipides tel le POPC ou le SOPC, comparé à DMPC.

Modélisation numérique Enfin, des simulations numériques des formes des vésicules ont été réalisées; nous citerons pour exemple [Goetz et al., 1999; Gompper and Kroll, 1994; Gompper and Kroll, 1998]. Elles permettent un accès à une forme précise des vésicules prévue par la théorie et dans ce cas particulier par le modèle ADE-SC. Ainsi récemment une comparaison précise entre les prédictions obtenues numériquement et les observations expérimentales a permis de déduire les paramètres physiques de la vésicule [Döbereiner et al., 2003].

B.2.3 Quelques paramètres modifiant les paramètres physiques

Effet de la température Le module de rigidité de courbure dépend de la température. En général il diminue légèrement lorsque la température augmente [Fernandez-Puente et al., 1994]; il faut aussi noter que lorsqu'on s'approche de la température de transition vers la phase cristal liquide ce module chute fortement à cause d'effets prétransitionnels [Méléard et al., 1997; Lee et al., 2001; Fragneto et al., 2003].

Enfin lorsqu'on élève la température, il n'est pas surprenant de trouver une aire stockée dans les fluctuations qui augmente et une baisse de la tension effective [Häckl et al., 1997]. En effet, les lipides ont des coefficient de dilatation linéique (pour des lipide en bicouche) bien plus élevé que celui de l'eau. Par exemple à 15 *degr*C le coefficient de dilatation linéique de SOPC est $\beta_{SOPC} \simeq 3.3 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p. 416] tandis que celui de l'eau est $\beta_{Eau} \simeq 0.052 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ [Weast, 1988]. Ainsi le rapport surface/volume de la vésicule augmente avec la température ce qui conduit logiquement à une baisse de la tension.

Renormalisation du module de rigidité de courbure par les fluctuations

Comme la tension est renormalisée et ainsi malgré une aire totale fixée, une tension effective apparaît (voir § B.1.5 p. 14), le module de rigidité de courbure est renormalisé par la présence des fluctuations, pour, comme on l'imagine, donner une valeur plus faible (il apparaît logique qu'une membrane froissée soit plus facile à courber), et surtout une valeur qui va dépendre de $q_{\perp}$ et donc de l'échelle à laquelle on mesure le module de rigidité de courbure de la membrane. C'est ce module que l'on mesure

effectivement dans les expériences [Peliti and Leibler, 1985].

$$\kappa_{eff} = \kappa - r \frac{k_b T}{4\pi} \ln \frac{L}{a} \quad (\text{I.1.19})$$

avec $r = 3$ dans notre cas, L la taille de la membrane et a un *cut-off* microscopique. Des simulations numériques [Gompper and Kroll, 1995; Gompper and Kroll, 1996] et des expériences [Roux et al., 1992] viennent étayer ce modèle. Dans le cas des GUVs, ce facteur de renormalisation est de l'ordre de $2kT$.

Perméabilité de la membrane à l'eau Les membranes lipidiques sont particulièrement imperméable à l'eau, avec une perméation typique de $1-10 \times 10^{-13} \text{ m}^3/\text{N.s}$; c'est en effet une des raisons pour lesquelles elle est utilisée par la cellule pour isoler son cytoplasme du milieu extérieur. Cette perméabilité diminue lorsqu'on s'approche de la température de transition vers l'état cristal liquide. Elle est mesurée à l'aide d'expérience de micropipettes ou de chocs osmotiques légers [Jansen and Blume, 1995; Bloom et al., 1991; Olbrich et al., 2000].

B.3 Influence de la composition

Nous allons présenter ici quelques exemples du rôle de la composition de la membrane sur sa forme et sur les différents paramètres physiques.

Module de courbure La composition de la membrane influence directement la valeur du module de rigidité de courbure. Par exemple l'addition de cholestérol rigidifie les membranes [Méléard et al., 1997; Song and Waugh, 1993]. L'augmentation du nombre d'insaturations sur la chaîne aliphatique fait décroître le module de rigidité de courbure de manière assez surprenante. Par ailleurs le module d'extension ne varie pas sensiblement avec la longueur des chaînes ou les insaturations [Rawicz et al., 2000] (voir tab. I.3). L'allongement de la chaîne par ailleurs amène plutôt à une légère rigidification du module de courbure [Fernandez-Puente et al., 1994; Fragneto et al., 2003].

La plupart des lipides ont une tête zwitterionique (phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine), ou chargée négativement (acide phosphatidique, phosphatidyl sérine, phosphatidyl inositol). Il est prévu dans le cadre de la théorie de Poisson-Boltzmann [Lipowsky and Sackmann, 1995b, pp 603 sq], [Bensimon et al., 1990] que le module de rigidité de courbure doit augmenter en présence de charge dans la membrane. Cet effet est faible et n'a cependant pas été observé expérimentalement. .

Présence de lysolipides L'addition de lysolipides va modifier la courbure spontanée, puisque leur tête polaire est plus grosse que leur queue, on s'attend logiquement à ce qu'ils favorisent une courbure spontanée positive de la bicouche qui les contient

Lipide	κ ($\times 10^{-20}$ J)
diC13:0	5.6
diC14:0	5.6
C18:0/1	9.0
C18:1/0	9.2
diC18:1	8.5
diC18:1 9-cis	0.85
diC18:1 9-trans	10.3
diC18:1 6-cis	9.0
C18:0/2	4.6
diC18:2	4.4
diC18:3	3.8
diC20:4	4.4
diC22:1	12

TAB. I.3 – Valeurs du module de rigidité de courbure pour quelques lipides à tête PC obtenue par des expériences de micropipettes. Cm:n dénote une chaîne d'acide gras pour un lipide contenant m atomes de carbone et n insaturations (d'après [Rawicz et al., 2000])

[Kooijman et al., 2003]. L'addition de lysolipides sur le feuillet extérieur va aussi conduire à un changement de forme de la vésicule (par exemple d'une forme oblate vers un état à deux vésicules) [Farge and Devaux, 1992]. Par ailleurs, le module de rigidité de courbure lui n'est pas significativement affecté [Fuller and Rand, 2001] pour des quantité de lysolipide allant jusqu'à 15 %. Enfin l'addition de lysolipide diminue fortement le module de compressibilité de la membrane, ce qui a pour conséquence de diminuer aussi la tension de lyse [Zhelev, 1998].

Perméabilité à l'eau Elle varie elle aussi en fonction du lipide choisi. A température égale, plus le nombre d'insaturations sur les chaînes est important, plus la perméation à l'eau augmente [Olbrich et al., 2000].

La nature de la tête influence aussi la perméabilité à l'eau : les phosphatidylcholines, ou les phosphatidylglycérols ont une perméabilité plus faible que les phosphatidylethanolamines ou phosphatidylserines ou l'acides phosphatidiques [Jansen and Blume, 1995].

Mélange de lipides Il faut remarquer que tous les lipides ne sont pas miscibles et qu'on peut observer des séparations de phase dans les mélanges de lipides (voir fig. I.13).

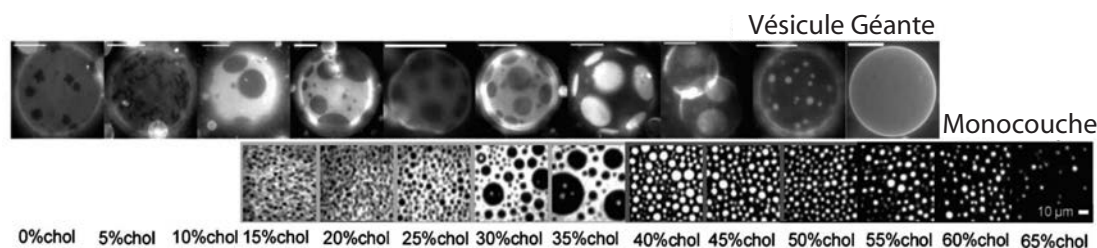


FIG. I.13 – Séparations de phase observés avec le mélange (POPC:DPPE 1:1 en rapport molaire) dans des GUVs et dans des monocouches. La phase fluide est fluorescente. On remarque que le cholestérol favorise le mélange des constituants. (d'après [Veatch and Keller, 2002]).

La séparation de phase dans des mélanges de lipides a été étudiée assez tôt, avant que les modèles de courbures ne permettent d'en rendre compte théoriquement [Leibler and Andelman, 1987]. Ces séparations de phase sont prévues théoriquement dans divers cas ; Andelman et al. le prévoient dans le cas où il existe un couplage entre la courbure et la concentration de chaque lipides et ainsi certaines zones courbées vont mieux convenir à certains lipides et d'autres à des lipides de forme différente (voir fig. I.4 p. 7) [Andelman et al., 1992]. Il a été également prévu que la séparation de phase pouvait induire la formation de domaine très courbés [Julicher and Lipowsky, 1993; Julicher and Lipowsky, 1996] en utilisant le modèle *Spontaneous*

Curvature. La vérification expérimentale est venue très récemment [Baumgart et al., 2003] (voir fig I.14).

Inversement, dans le cadre du modèle ADE-SC, Seifert a proposé que la courbure de la membrane pouvait induire la séparation de phase [Seifert, 1993]. Ceci a été aussi montré expérimentalement au laboratoire [Roux et al., 2004] récemment en montrant que la composition de nanotubes (très courbés) était différente de celle de la GUV à partir de laquelle ils avaient été formés.

Un vésiculation plus générale est prévue avec seulement le modèle SC, avec l'addition d'un terme rendant compte de l'énergie du col fin entre les deux vésicules en train de se séparer [Lipowsky, 1993].

Des simulations de Monte-Carlo ont montré qu'en fonction de la mobilité on pouvait avoir deux comportements distincts. Pour une mobilité élevée, on a du bourgeonnement (*budding*) qui apparaît. Dans le cas d'une mobilité faible, on a des domaines qui se forment, et qui courbent la membrane et la froissent [Sunil Kumar and Madan, 1998; Sunil Kumar et al., 1999]. Le modèle est par ailleurs étendu à trois composants, où on trouve un comportement proche.

Récemment grâce à la microscopie à deux photons, on a pu commencer l'étude des formes des domaines lors de la séparation de phase [Bagatolli and Gratton, 2000].

Enfin, notons que la présence de cholestérol favorise le mélange des constituants comme les sphingolipides et les phosphatidyl cholines [Veatch and Keller, 2002] (voir aussi fig. I.13).

B.4 Inclusions de protéines ou de peptides dans les membranes

B.4.1 Cas général

Les membranes biologiques contiennent une forte proportion de protéines membranaires. Des peptides peuvent aussi y être insérés. Les conséquences de la présence d'inclusions dans les membranes ont donc été étudiées à la fois théoriquement et expérimentalement. Nous allons résumer les principaux résultats. D'un point de vue théorique, la présence d'inclusions dans une membrane peut conduire à un couplage entre la concentration d'inclusions et la courbure de la membrane. Ce couplage se fait avec la concentration surfacique simple ρ dans le cas d'une inclusion sur un seul feuillet [Leibler, 1986], mais avec la concentration «algébrique» (qui tient compte du sens de la protéine, chose importante, si celle-ci est conique) dans le cas de protéines transmembranaires (les inclusions vont alors aller dans les régions de la membrane dont la courbure correspond à leur conicité). Dans le cas où les inclusions viennent diminuer le module de rigidité de courbure, des «instabilités de courbure» sont même attendues [Fournier, 1996]. Dans le cas qui nous intéresse de membranes contenant des protéines membranaires, on ne retiendra dans un premier temps que le couplage courbure-concentration des protéines, et on introduira un terme supplémentaire de compressibilité qui tend à faire diffuser les protéines pour équilibrer les concentrations [Ramaswamy et al., 2000] (voir chapitre I.2 p. 39). La membrane peut aussi être déformée par les inclusions (en particulier les protéines membranaires), si l'épaisseur de la bicouche est différente de celle des inclusions. La perturbation des

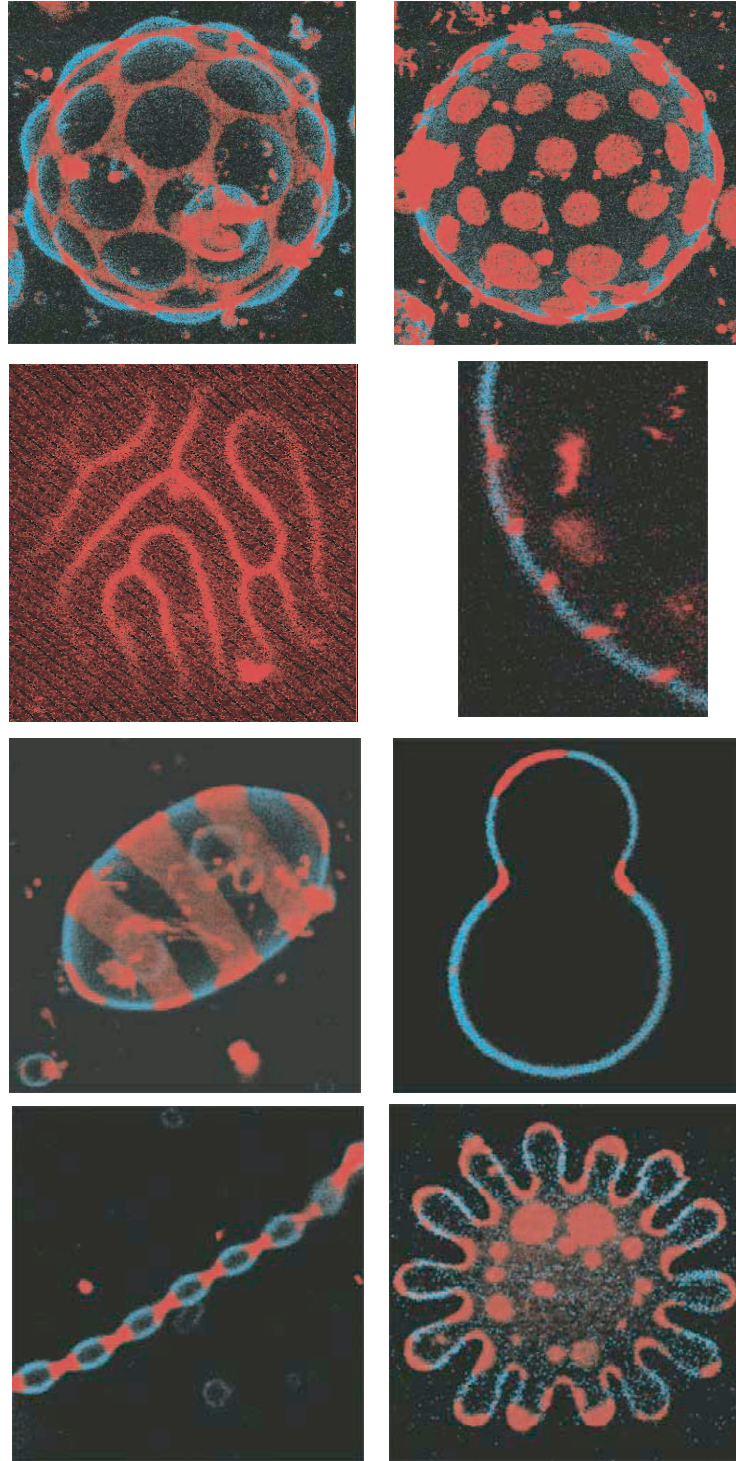


FIG. I.14 – *Séparation de phase observée en microscopie à deux photons sur des GUVs. On observe la coexistence entre une phase L_o (composée de Sphingomyeline et Cholestérol) et L_d (composée de DOPC). La proportion de chaque lipide est variable. La phase L_o est marquée à l'aide de perylène (en bleu) et la phase L_d par du rho-DPPE (en rouge). On a superposé pour chaque image, les canaux bleu et rouge. La température est variable entre 25°C et 50°C (d'après [Baumgart et al., 2003]).*

lipides par des protéines peut conduire à des interactions attractives entre inclusions [Dommersnes and Fournier, 1999; Dommersnes, 1999; Fournier, 1999].

Un autre effet est l'interaction entre les inclusions via la membrane [Goulian et al., 1993], ce qui peut conduire à l'agrégation des inclusions [Kim et al., 1998; Kim et al., 1999]. Dans le cas de membrane à plusieurs composants, en fonctions de la courbure spontanée et de la taille des lipides, les inclusions peuvent provoquer une modulation de la composition voire une séparation de phase globale [Sens and Safran, 2000].

Sur le plan expérimental, peu de travaux existent, on peut citer la légère diminution du module de rigidité de courbure due l'inclusion de peptides : la Gramicidine ou la mélitine [Gerbeaud, 1998; Méléard et al., 1998], ou encore l'étude de la cinétique de dimérisation de la Gramicidine [Goulian et al., 1998]

B.4.2 Cas particulier des protéines membranaires

L'inclusion de protéines dans les membranes des vésicules pour former des protéoliposomes est une des premières applications des vésicules ; en effet de nombreuses protéines remplissant des rôles essentiels dans les cellules sont membranaires. La vésicule offre la possibilité de reconstituer ces protéines dans un environnement simplifié afin d'en étudier leur fonction. Les GUVs permettent de reproduire un système ayant la même échelle que la cellule, et qui peut être étudié en microscopie optique ; c'est pourquoi nous avons développé une méthode de fabrication générale de protéoliposomes géants.

La protéine va d'une part agir sur la membrane en tant qu'inclusion, mais elle va de plus avoir une fonction biologique qu'il conviendra de préserver lors de la reconstitution de la protéine dans la membrane. En particulier pour fabriquer des membranes actives (voir chapitre I.2 p. 39). En tant qu'inclusion la protéine peut perturber les lipides qui l'entourent. Elle a un domaine transmembranaire (de longueur d_P) hydrophobe qui doit être protégé du contact avec l'eau ; rôle rempli par les lipides dont l'épaisseur des chaînes dans la bicouche est d_L . On appelle $d_P - d_L$ le décalage hydrophobe (*hydrophobic mismatch*). s'il est positif les lipides doivent s'écarter pour s'adapter à la protéine, dans le cas contraire ils doivent se comprimer, avec évidemment un coup énergétique pour ces adaptations [Lipowsky and Sackmann, 1995a, p 388]. Le décalage hydrophobe est utilisé comme paramètre d'ordre lors de la plupart des études numériques ou théoriques de ce point [Bloom et al., 1991; Sperotto and Mouritsen, 1991; Fattal and Ben-Shaul, 1993; Mouritsen and Bloom, 1993].

A l'inverse, les déformations de la bicouche lipidique peuvent théoriquement conduire à une modulation de l'activité des protéines. Par ailleurs, la tension va modifier le décalage hydrophobe et peut donc influencer par ce biais le fonctionnement de la protéine qui sera bien sûr optimal lorsque le décalage hydrophobe est minimal [Cantor, 1997; Goulian et al., 1998]. Réciproquement on trouve que les propriétés physiques de la membranes telle la température de transition vers la phase gel sont modifiées de manière minimale lorsque le décalage hydrophobe est nul. Une telle étude a par exemple été menée sur la bactériorhodopsine [Cherry et al., 1978; Heyn et al., 1981].

Par ailleurs, des systèmes contenant des mélange de lipide vont conduire à des comportements plus complexes comme le tri de lipides pour s'adapter au mieux à la protéine dans son voisinage immédiat (*molecular sorting* ou *molecular selectivity*) [Sperotto and Mouritsen, 1993; Dumas et al., 1997].

Ces quelques exemples de cas simple ne doivent pas masquer un comportement des protéines dans les membranes biologiques bien plus complexe, faisant rentrer en jeu non seulement le décalage hydrophobe dont nous avons parlé mais aussi les liaisons hydrogènes, les interactions entre les charges des lipides et des protéines, les forces de Van der Waals, etc. . .

A ce jour, il n'existe pas d'études expérimentales systématiques sur les conséquences de la présence de protéines membranaires sur les propriétés physiques des membranes. Les mesures de rigidité de courbure des membranes contenant de la bactériorhodopsine semblent donner des résultats contradictoires : une diminution du module de rigidité de courbure pour des membranes de SOPC et des concentrations de BR apparemment très faibles [Gerbeaud, 1998] mesurée par analyse de contours, et pas d'effet sur le module de rigidité de courbure pour des membranes d'EPC mesurées par des expériences de micropipettes [Manneville et al., 2001].

B.5 D'autres sortes de vésicules géantes

Des membranes de composition encore plus complexes ont été étudiées. Nous allons résumer ici les observations réalisés sur ces différents systèmes.

B.5.1 Vésicules et protéines solubles

Des vésicules peuvent être fonctionnalisées par des protéines solubles. Pour fixer les protéines sur les membranes, il est possible d'utiliser les interactions de type «récepteur-ligand», comme la streptavidine et la biotine, ou la chélation d'ions métalliques [Puech, 2003, chapitre 3]. Par exemple il est relativement facile d'obtenir des lipides et les protéines qu'on veut greffer fonctionnalisées avec de la biotine, le lien entre les deux étant assuré par la streptavidine, molécule capable de se lier fortement avec quatre biotines au maximum (pour un exemple d'un tel système voir [Roux et al., 2002; Helfer et al., 2000]). Les propriétés des vésicules recouvertes de protéines peuvent être différentes des vésicules nues. On peut distinguer deux régimes : si la protéine atteint une concentration surfacique suffisante pour former un cristal à deux dimensions, alors les propriétés de la vésicule sont fortement modifiées et la membrane décorée se comporte comme un fluide viscoélastique. Dans le cas contraire, les modifications sont moindres et les constantes physiques caractérisant notamment le comportement élastique de la vésicule sont peu affectées [Ratanabanangkoon et al., 2003].

Cette technique est très utile car elle peut éviter la reconstitution de protéines membranaires complètes quand on ne veut étudier que les interactions entre des fragments de protéines par exemple. Il suffit alors de fixer ce fragment sur la membrane [Puech, 2003].

B.5.2 Vésicules décorées de polymères

Les membranes biologiques sont naturellement recouvertes de polymères, ce qui permet de limiter les contacts entre cellules. Cette couche fait partie d'un édifice plus complexe appelée glycocalix [Alberts et al., 1989, pp. 299-300]. Un système biomimétique constitué d'une vésicule géante sur laquelle est greffée une couche de polymères solubles (du polyéthylèneglycol par exemple) a été réalisé [Baekmark et al., 1995; Bruinsma et al., 2000]. Le même type d'expériences a aussi été réalisé sur des petites vésicules [Kuhl et al., 1994].

Par ailleurs, d'un point de vue plus physique, les conséquences d'une couche de polymère greffée à la surface d'une vésicule géante ont été étudiées. Les auteurs mesurent une augmentation du module de rigidité de courbure d'une manière significativement différente de celle attendue d'après les lois d'échelles, et éventuellement des séparations de phases entre les lipides portant le polymère en excès et une autre phase comportant les lipides simples, saturés en lipides greffés [Evans and Rawicz, 1997]. Des travaux théoriques et des simulations numériques ont aussi étudié les formes prises par ces vésicules, ainsi que les modifications physiques de la membrane afin d'offrir un modèle prédictif [Breidenich et al., 2000].

Enfin, on peut noter le fait que les vésicules décorées sont étudiées également dans le but d'en faire un vecteur de substance médicamenteuse qui ne soit pas détruit par le système immunitaire [Martin and Lasic, 1995]. Ce sont en général des vésicules de tailles intermédiaires plus faciles à préparer et moins fragiles («liposomes furtifs»).

Pour une revue sur les membranes décorées, on pourra se reporter à [Lipowsky, 1997].

B.5.3 Polymersomes

On peut faire des vésicules à partir de polymères diblocs, comprenant comme les lipides une partie amphiphile et une partie hydrophobe ; on les appellera polymersomes (voir fig. I.15) [Discher et al., 1999; Discher et al., 2002]. Il ont des propriétés proches des vésicules lipidiques, comme le module de rigidité de courbure, qui a dans le cas du OE-7 ($t\text{-butyl} - [\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)]_{37} - [\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O}]_{40} - \text{H}$) une valeur de 8×10^{-20} J ou le module d'étirement, qui pour OE-7 vaut 180 mN/m. Par contre ils sont moins perméables à l'eau et résistent à des taux de dilatation d'aire avant la lyse beaucoup plus élevés (pour OE-7, $\alpha_C = 0.19$) [Discher et al., 1999]. On pourra noter aussi la possibilité d'observer un phénomène comme l'instabilité de perlage (*perling*) avec une dynamique beaucoup plus lente grâce aux propriétés spécifiques des polymersomes [Reinecke and Döbereiner, 2003].

Il est possible de polymériser ces membranes afin d'obtenir des coques identiques aux vésicules mais beaucoup plus résistantes mécaniquement (module de rigidité de courbure, d'étirement, tension de lyse plus élevés par exemple), physiquement (perméation, séchage, soumission au vide, réhydratation) et chimiquement (résistance au chloroforme par exemple). Ces propriétés peuvent être modulées en polymérisant uniquement une fraction des polymères de la membrane [Discher et al., 2002]. Les polymersomes peuvent de plus avoir un intérêt dans la vectorisation de substances dans l'organisme à des fins thérapeutiques.

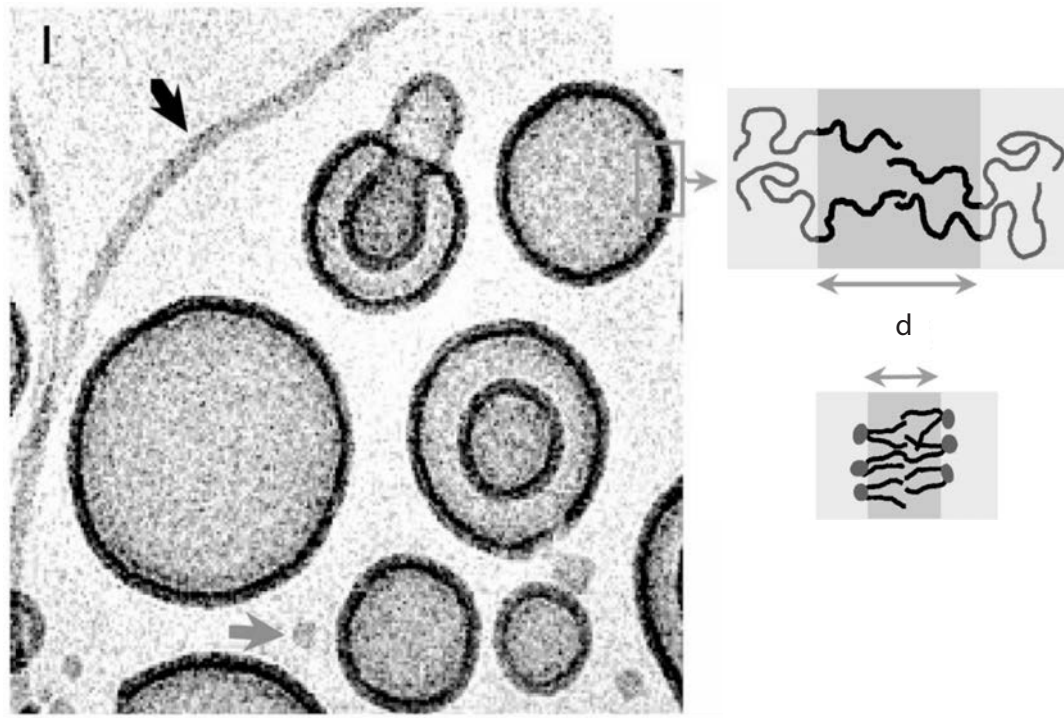


FIG. I.15 – *A gauche : Polymersomes. Image en cryo-TEM d’une suspension de vésicules de OE-7 ($t\text{-butyl}-[CH_2-CH(C_2H_5)]_{37}-[CH_2-CH_2-O]_{40}-H$). On pourra noter une micelle indiquée par la flèche grise et une micelle cylindrique indiquée par la flèche noire. La barre située en haut à gauche représente 20 nm. A droite : Une représentation schématique à l’échelle, en haut d’une membrane de polymère dibloc et en bas d’une membrane lipidique «classique». D’après [Discher et al., 1999].*

B.5.4 Membranes lipidiques polymérisées

Des membranes lipidiques ont été aussi partiellement ou entièrement polymérisées. C'est ainsi qu'on a pu stabiliser un certain nombre de formes de vésicules de topologie complexe [Fourcade et al., 1992] ou des pores qu'on maintient ouverts grâce à la polymérisation sans que, comme c'est le cas pour les vésicules lipidiques ordinaires, le pore ne se cicatrise ou la vésicule n'éclate [Bradley et al., 1997].

C. Diverses techniques d'investigation des vésicules géantes

De nombreuses techniques ont été développées au cours des années pour étudier les propriétés physiques des vésicules géantes. Nous allons maintenant présenter rapidement les principales techniques d'étude des vésicules géantes en ne donnant que le principe, et quelques références où le lecteur pourra trouver plus de détails sur leur utilisation. Il faut noter que les deux les plus utilisées sont la reconnaissance de contours et les micropipettes.

C.1 Observation directe, reconnaissance de contours

La technique la plus naturelle a été l'observation directe au microscope. C'est en effet un des grands avantages des vésicules géantes que de pouvoir être observées au microscope optique. Le principe général a été de détecter la position de la membrane (en partie ou totalement) et d'ensuite analyser les contours (ou une portion). La technique s'est développée de différentes façons aux cours des années. Nous détaillerons au chapitre II.1 p. 57 son évolution et son état actuel. C'est en effet cette technique que nous avons développée plus avant dans cette thèse.

C.2 Expériences de micropipettes

Une autre technique classique, mise au point par Evans [Evans and Needham, 1987; Evans and Rawicz, 1990] est l'utilisation de micropipettes. Elle consiste à «défroisser» la vésicule en l'aspirant dans une micropipette et à mesurer la relation entre la surface ainsi défroissée et la pression de succion appliquée à la membrane. L'analyse de l'excès de surface obtenu en mettant progressivement sous tension la vésicule permet de mesurer le module de rigidité de courbure, le module d'extension, et éventuellement la perméabilité par exemple [Rawicz et al., 2000]. Nous détaillerons plus cette technique au § B.1 p. 50.

C.3 Tubes de membranes

Il est possible de former des tubes de membranes lorsqu'on exerce une force localisée sur une vésicule géante. Ceci est possible en fixant un point de la vésicule et en la plaçant dans un flux [Waugh, 1982; Rossier et al., 2003], en utilisant la gravité [Bo and Waugh, 1989], ou en tirant sur la membrane par l'intermédiaire d'une bille piégée dans une pince optique [Raucher and Sheetz, 1999; Koster et al., 2003]. La force nécessaire pour tirer un tube dépend de la tension et du module de rigidité de courbure. La technique a été utilisée pour comparer les modules de rigidité de courbure de membranes, ou pour mesurer la friction intramembranaire [Evans and Yeung, 1994]. Cependant si la tension pouvait être fixée (par une micropipette par exemple), cette technique pourrait fournir assez facilement le module de rigidité de courbure de nombreux types de membranes à partir de la mesure de la force.

C.4 Diffusion de billes

Afin d'étudier les propriétés viscoélastiques de la bicouche en tant que fluide bidimensionnel, une expérience devenue maintenant classique est de mettre une ou plusieurs billes dans la membrane dont la mesure du déplacement (par le seul fait de la diffusion brownienne, par gravité, ou à l'aide de pince optique) va nous permettre la mesure du module de cisaillement, de la constante de diffusion, ou encore de manière indirecte le module de rigidité de courbure [Dimova et al., 2000].

C.5 *Reflexion Contrast Interference Microscopy*

Le principe de cette technique est de faire interférer les rayons réfléchis par la paroi de la vésicule et par la surface de la lamelle de verre. Moyennant un dispositif de polarisation adapté on peut supprimer toute réflexion parasite [Rädler and Sackmann, 1993; Wiegand et al., 1998].

Ce système a été utilisé pour mesurer les fluctuations, mais s'est avéré assez limité dans cet usage [Rädler et al., 1995]. Son principal intérêt est plutôt l'étude de l'adhésion puisqu'on peut connaître avec une grande précision la distance entre le bas de la vésicule et la surface. Ainsi cette technique a permis l'étude par exemple de l'adhésion entre des surfaces chargées [Nardi et al., 1998], entre des surfaces et des vésicules décorées respectivement de ligands et de récepteurs [Bruinsma et al., 2000; Kloboucek et al., 1999; Boulbitch et al., 2001; Cuvelier and Nassoy, 2004] (voir fig. I.16).

C.6 Méthode d'étude en microscopie confocale

Dans les méthodes d'étude du spectre de fluctuation, on peut mentionner le développement récent d'une méthode originale de mesure des fluctuations, qui a conduit à la mesure de module de rigidité de courbure [Lee and Wang, 1997; Lee et al., 2001]. Le principe est le suivant (voir fig. I.17 p. 35) : en soumettant une vésicule à

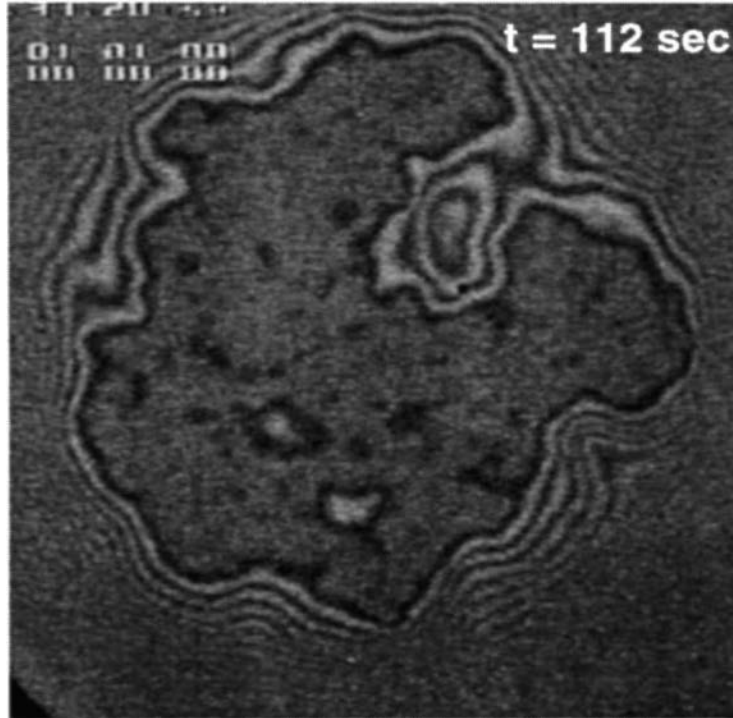


FIG. I.16 – Image d'une vésicule en adhésion sur un substrat. La partie centrale de l'image entourée d'un anneau indique une zone où la vésicule est distante du substrat de moins d'une longueur d'onde de la lumière (monochromatique) utilisée ; La membrane est d'autant plus près que la couleur est proche du noir. Les zones grises indiquent ainsi de l'adhésion faible quand les zones noires indiquent des zones d'adhésion forte. Chaque anneau autour de cette zone centrale indique alors que la distance a augmenté d'une longueur d'onde. (D'après [Bruinsma et al., 2000]).

un éclairage laser principal (Nd-Yag, voir fig. I.17), on peut calculer la pression de radiation sur la vésicule et calculer sa déformation et notamment son «écrasement» en connaissant ses paramètres physiques, notamment le module de rigidité de courbure. Par ailleurs en utilisant un deuxième laser de puissance plus faible que le premier

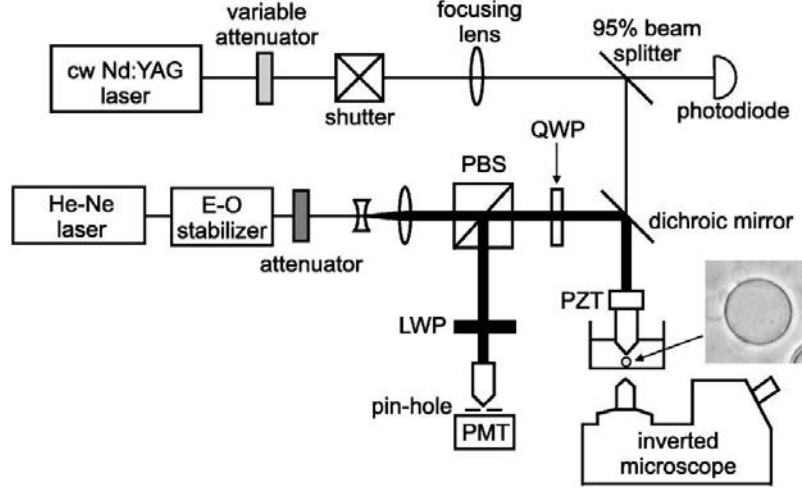


FIG. I.17 – Schéma de l'expérience de mesure du module de rigidité de courbure en microscopie confocale. LWP : filtre passe bas, PBS : Séparateur de faisceau selon la polarisation, PMT : tube Photomultiplicateur, PZT : commande piezzoélectrique, QWP : lame quart d'onde (d'après [Lee et al., 2001]).

et d'une autre longueur d'onde (He-Ne), pour l'observation uniquement, en plaçant la mise au point sur la membrane supérieure de la vésicule dans un montage de microscope confocal inversé avant l'éclairage avec le laser principal, on peut lorsque celui-ci exerce une pression sur la vésicule, calculer son déplacement par rapport au plan focal, à partir de la luminosité de la vésicule dans la couleur du laser secondaire, et remonter ainsi à sa déformation et finalement au module de rigidité de courbure.

C.7 Flux hydrodynamique

Le mouvement et la forme des vésicules posées sur une surface soumises à un flux hydrodynamique ont été étudiés à la fois théoriquement et expérimentalement [Cantat and Misbah, 1999; Seifert, 1999]. On observe un mélange de glissement et de roulement, et l'apparition d'une force verticale agissant sur la vésicule. Ces prévisions et ces mesures viennent donner un support physique à des problèmes biologiques tel le mouvement des globules blancs dans les capillaires sanguins.

C.8 Déformation sous champ magnétique/champ électriques

La déformation des vésicules sous champ électrique ou magnétique a été très tôt un moyen d'étude des vésicules ; c'est ainsi qu'Helfrich dès 1973 au moment où

il proposait une forme théorique pour l'énergie de courbure [Helfrich, 1973a], proposait d'étudier les propriétés physiques des vésicules par déformation sous champ magnétique [Helfrich, 1973b; Bacri et al., 1996]. Plus récemment, des expériences de déformation par un champ électrique ont permis une mesure du module de rigidité de courbure [Kummrow and Helfrich, 1991].

D. Quelques applications, intérêt pour la biologie

Les vésicules géantes permettent de réaliser des systèmes biomimétiques permettant de dégager les paramètres pertinents pour le phénomène biologique que l'on veut étudier dans un contexte plus simple que le milieu cellulaire. Enfin, elles sont présentes comme possible vecteur de médicaments voire d'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) dans le corps, pour traverser les diverses barrières et délivrer leur contenu sur une cible thérapeutique [Cattel et al., 2003; Lasic and Templeton, 2000].

D.1 Système modèle

La vésicule, dans la mesure où sa membrane est proche de la membrane plasmique cellulaire (débarassée du glycocalix et du cytosquelette), est un système permettant de modéliser dans des conditions physiques simples et reproductibles certains comportements cellulaires. Des phénomènes aussi essentiels que les changements de formes [Sackmann, 1994], le bourgeonnement (*budding*) [Menger and Keiper, 1998], l'exocytose [Cans et al., 2003] ont été largement décrits dans ces revues. Des expériences pour inclure l'effet du cytosquelette (microtubules et des filaments de F-actine) ont aussi été menées [Hotani et al., 1999]. Les effets hydrodynamiques, les effets de réactions chimiques ou de l'activité des protéines, ou encore la lyse cellulaire sont reportés dans [Döbereiner, 2000c, et références à l'intérieur].

D.2 Système biomimétique

Nous allons nous contenter ici de donner quelques exemples de systèmes biomimétiques utilisant des GUVs.

- On peut considérer que le globule rouge est le premier système modèle à avoir été étudié; en effet il est dépourvu de noyau et d'organelle cellulaire et son cytosquelette se réduit à un simple réseau de spectrine à deux dimensions. De surcroît, lorsque la fabrication des GUVs n'était pas encore au point, c'était un système relativement simple et facilement accessible [Deuling and Helfrich, 1976; Elgsaeter et al., 1986; Sackmann et al., 1986; Strey et al., 1995].
- La formation de nanotubes lipidiques par des moteurs moléculaires se déplaçant sur des microtubules et fixés à la membrane de GUVs a permis de montrer

que les moteurs moléculaires seul permettaient de reproduire *in vitro* la formation d'intermédiaires de transport tubulaires observés *in vivo*, en l'absence de toute autre protéine (voir fig. I.18). Les études expérimentales couplées à des approches théoriques [Derényi et al., 2002] ont permis d'appréhender le rôle des tubes de membranes dans le transport intracellulaire [Roux et al., 2002; Roux et al., 2004; Koster et al., 2003; Leduc et al., 2004].

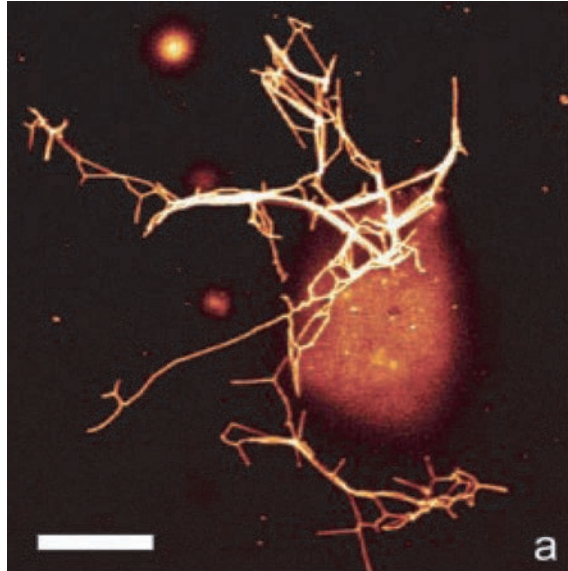


FIG. I.18 – Réseau de tubes de membranes vue en microscopie de fluorescence confocale. La vésicule (hors focus) et les tubes sont composées d'Egg Phosphatidyl Choline (EPC) avec 1% molaire de BODIPY 530A550 C5-HPC. La barre représente 5 μm (d'après [Roux et al., 2002].).

- On peut noter que ces dix dernières années, des systèmes à base de vésicules et de polymères ont été mis au point pour simuler puis comprendre les propriétés du glycocalix [Bruinsma et al., 2000], et du cytosquelette [Boey et al., 1998; Discher et al., 1998].
- Citons pour finir la mise au point d'un système minimal mimant le déplacement de la *Listéria* par polymérisation d'une «comète» d'actine derrière des billes tout d'abord puis des vésicules ensuite [Giardini et al., 2003]. Ce système minimal a permis de comprendre le mode de propulsion physique de ces bactéries.

Chapitre I.2

Les membranes actives



DANS LA CELLULE, la membrane plasmique isole non seulement le milieu cytoplasmique du milieu extérieur, mais joue aussi un rôle très important dans nombre de processus grâce à des protéines qui sont insérées dans cette membrane. Les fonctions de ces protéines sont multiples : signalisation, reconnaissance, exocytose, endocytose, fusion, formation de gradient de substances chimiques, adhésion, etc. . . . Nombre de ces protéines consomment de l'énergie pour remplir leur fonction, fournie sous forme de lumière, d'ATP, de gradient électrochimique, voire d'énergie mécanique. Pour cette raison, les membranes biologiques ne peuvent pas être décrites correctement par le modèle de membranes à l'équilibre décrit précédemment (voir B.2.1 p. 16). De nouveaux modèles ont été développés qui incluent l'activité hors-équilibre de canaux ioniques ou de pompes. Les premiers modèles ont été mis au point par J. Prost et ses collaborateurs [Prost and Bruinsma, 1996; Prost et al., 1998; Ramaswamy et al., 2000; Manneville et al., 2001]. Nous allons rappeler ici les principales prédictions qui ont été faites pour les membranes actives. Par ailleurs, d'autres modèles sont venus ensuite compléter cette première approche en incluant les processus de fission et de fusion et en décrivant des membranes hors-équilibre où le nombre de lipides n'est donc pas constant [Rao and Sarasij, 2001; Girard et al., 2004a]. On pourra se reporter à [Ramaswamy and Rao, 2001] pour une revue sur les membranes actives.

A. Modèle théorique des membranes actives

La prise en compte de l'effet de l'activité de canaux ou de pompes ioniques sur les fluctuations de la membrane a motivé la mise en place du modèle de membrane active. Cette théorie a été développée d'abord au laboratoire par J. Prost et ses collaborateurs (R. Bruinsma, J. Toner, S. Ramaswamy) (voir [Prost and Bruinsma, 1996; Prost et al., 1998; Manneville et al., 2000; Manneville et al., 2001]). Des expériences également réalisées au laboratoire ont ensuite permis d'affiner et de confirmer les prédictions théoriques [Manneville et al., 1999; Manneville et al., 2000; Manneville et al., 2001]. On va se contenter ici de donner les résultats principaux du modèle dans sa forme actuelle et les points importants pour l'interprétation de nos expériences d'analyse de contours. Nous allons détailler les termes qui rentrent dans les

équations à l'origine du modèle, puis les principaux résultats.

On reprendra la même notation qu'au § B.2.1 p. 16 dans ce qui va suivre et on se reportera à la fig. I.9 p. 16.

A.1 Equations des membranes actives

A.1.1 Hamiltonien

Le hamiltonien que nous utiliserons prend en compte les termes «classiques» de déformations de la bicouche lipidique, et inclue aussi la présence d'inclusions (les protéines) dans cette bicouche. Il est général à toute membrane à 2 composants. On pourra se reporter à la fig. I.19 pour une illustration schématique des différents termes entrant dans l'expression du hamiltonien.

Hamiltonien de Canham-Helfrich On reprend de la même manière qu'au § B.2.1 p. 16 les termes de courbure et de tension, en notant $u(\mathbf{r}_\perp)$ l'écart au point $\mathbf{r}_\perp$ au plan moyen en mesure algébrique. Avec σ la tension et κ le module de rigidité de courbure, on obtient pour la partie membrane lipidique le Hamiltonien (qui correspond aux termes 1 et 2 du hamiltonien complet eq. I.2.4 p. 42 :

$$H_{lip} = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 \right] dS \quad (\text{I.2.1})$$

Complément du Hamiltonien du à la présence des protéines La protéine va intervenir au travers de deux termes :

- le premier indique le couplage entre la courbure de la membrane et la diffusion de la protéine ; en effet il est logique de penser que suivant sa forme une protéine diffusera pour se localiser dans les zones où la courbure est la plus adaptée à sa forme. Ce terme s'écrit (ce sera le troisième terme de l'eq. I.2.4 p. 42) :

$$H_{cd} = \iint_A 2\Xi \psi \nabla_\perp^2 u dS \quad (\text{I.2.2})$$

Avec Ξ le coefficient de couplage et ψ la concentration «algébrique» de protéines, c'est-à-dire une concentration où on compte positivement les protéines dans un sens et négativement celles dans l'autre ; si ρ^+ est la concentration de protéines dans un sens et ρ^- la concentration dans l'autre, alors $\psi = \rho^+ - \rho^-$.

- A ce terme, vient se rajouter un terme qui va le contrebalancer qui est dû tout simplement à la diffusion des protéines des zones plus concentrées vers les zones moins concentrées. Il s'écrit :

$$H_d = \iint_A \frac{\chi}{2} (\psi - \psi_0)^2 dS \quad (\text{I.2.3})$$

avec χ le module de compressibilité pour la diffusion des protéines dans la membrane et ψ_0 la concentration «algébrique» de protéine optimale.

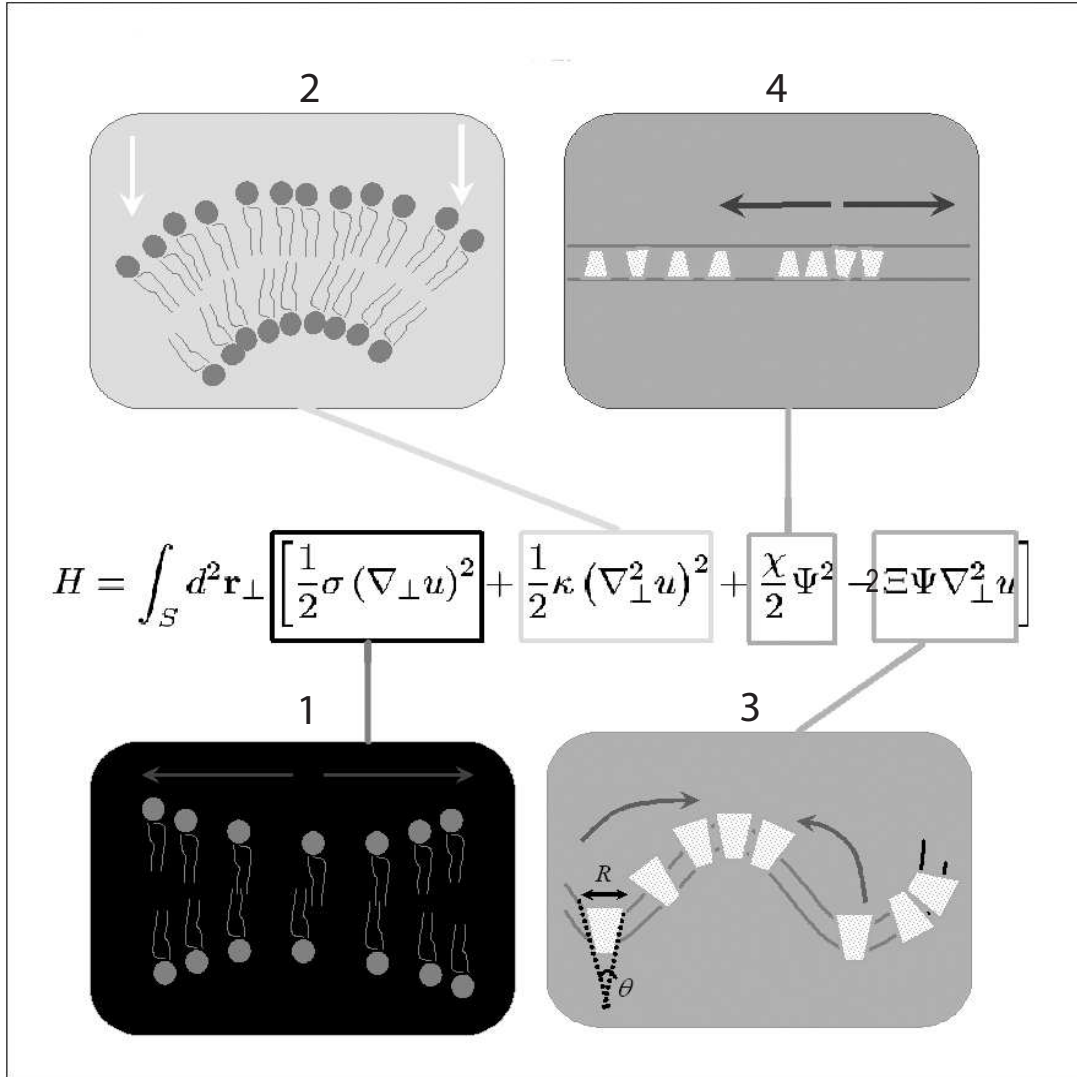


FIG. I.19 – Représentation schématique des quatre termes du hamiltonien : 1. terme de tension qui modélise plus le défroissage à une échelle sub-microscopique que l'étirement réel (on fait l'hypothèse que l'aire réelle A est constante) ; 2. terme de courbure, où on a négligé la courbure spontanée ; 3. terme de couplage courbure-diffusion ; 4. terme de diffusion des protéines, où on a supposé $\psi_0 = 0$ soit que les protéines sont incluses dans la membrane de manière symétrique.

Ces deux derniers termes négligés dans une première version de la théorie ont été rajouté par la suite pour prendre en compte cet effet qui comme on le verra conduit à la renormalisation du module de rigidité de courbure [Manneville, 1999; Manneville et al., 2001]. On peut alors finalement écrire le hamiltonien complet de notre système [Manneville et al., 2001] :

$$H = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla u)^2 + 2\Xi \psi \nabla_{\perp}^2 u + \frac{\chi}{2} (\psi - \psi_0)^2 \right] dS \quad (\text{I.2.4})$$

A.1.2 Equation de perméation

Dans un premier temps, l'effet de l'activité de la protéine a été modélisé comme une force active de perméation, c'est à dire comme une force perpendiculaire à la membrane exercée sur celle-ci lors du pompage. Nous verrons dans le paragraphe suivant que cette contribution n'est probablement pas dominante pour les pompes ioniques, et peut même être négligée dans le cas de la BR. L'équation s'écrit alors, avec v_z la vitesse du fluide traversant la membrane suivant z , F_a la partie de la force active indépendante de la courbure et F'_a la partie dépendante de la courbure, f_{th} une force stochastique modélisant l'effet du mouvement brownien des molécules du solvant sur la membrane et ρ la concentration surfacique en protéines (indifféremment du sens, $\rho = \rho^+ + \rho^-$) :

$$\frac{\partial u((r)_{\perp}, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_{\perp}, z = u(\mathbf{r}_{\perp}, t), t) = \lambda_p [\delta P(\mathbf{r}_{\perp}, t) + f_{th}(\mathbf{r}_{\perp}, t) + F_a \psi(\mathbf{r}_{\perp}) + F'_a \rho(\mathbf{r}_{\perp}, t) \Delta_{\perp} u(\mathbf{r}_{\perp}, t)] \quad (\text{I.2.5})$$

On pourra se reporter à la fig. I.20 pour une illustration schématique de cette équation.

Par ailleurs la théorie prévoit des régimes d'instabilités dans le cas d'un couplage entre la courbure et le pompage ; en effet si le pompage induit la courbure de la membrane favorable à la protéine, cela induit une intensification du pompage, et conduit donc à une instabilité [Ramaswamy et al., 2000]. Néanmoins cet effet n'a pas encore été observé expérimentalement.

A.1.3 Equation de Stokes

On écrit l'équation du fluide environnant la membrane. Dans cette équation, on néglige les termes inertiels. En effet, à l'échelle où on se place, on a un bas nombre de Reynolds et donc l'eau peut être considérée comme un fluide visqueux. A cette équation vient se rajouter une contribution plus subtile de l'activité de la protéine modélisée sous la forme d'un dipôle de force hydrodynamique. En effet lorsque une pompe ou un canal est actif pour pomper, cela se traduit souvent par des changements de conformation plus ou moins importants ; ces changements de conformation n'exercent pas de force résultante sur le fluide environnant (on peut comparer cela à un baigneur dans une piscine qui nage, la somme des forces qu'il applique sur l'eau est

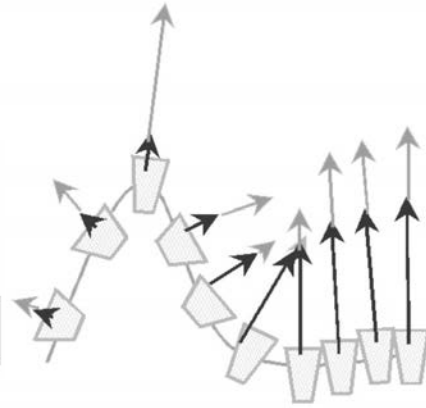
$$\frac{\partial(\mathbf{r}_\perp, t)}{\partial t} - v_z(\mathbf{r}_\perp, z = u(\mathbf{r}_\perp, t), t) = \lambda_p(\delta P(\mathbf{r}_\perp, t) + f_{th}(\mathbf{r}_\perp, t) + \boxed{F_a \Psi(\mathbf{r}_\perp, t)} + \boxed{F'_a \rho \Delta_\perp u(\mathbf{r}_\perp, t)})$$


FIG. I.20 – Représentation schématique des deux derniers termes de l'équation de perméation : la force active non-dépendante (avant dernier terme) et dépendante (dernier terme) de la courbure.

nulle), mais à l'ordre supérieur un dipôle de force existe du fait des différents points d'application des forces (pour continuer la comparaison au baigneur, c'est aussi un dipôle de force hydrodynamique que celui-ci exerce sur l'eau lorsqu'il nage, et cela lui permet de se déplacer dans l'eau). On pourra se reporter à la figure III.11 p. 148 où on voit les changements de conformation de la protéine lors d'un cycle de pompage. Ce dipôle hydrodynamique actif, comme la force active (contribution dans l'équation de perméation), comporte deux contributions : une contribution indépendante de la courbure (terme contenant F_a) et une contribution dépendant de la courbure (terme contenant F'_a). On suppose que ces contributions ont leurs points d'application sur un axe parallèle à l'axe (Oz) et situées aux points de côte $w^\uparrow$ et $-w^\downarrow$. De plus se rajoute une force stochastique représentant le mouvement brownien des molécules du milieu environnant la membrane $\mathbf{f}_h$. Cela conduit à l'équation suivante, avec $\hat{\mathbf{z}}$ le vecteur unitaire suivant (Oz) :

$$0 = -\nabla P(\mathbf{r}, t) - \frac{\delta H}{\delta u}(\mathbf{r}_\perp, t) \delta(z) \hat{\mathbf{z}} + F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \psi(\mathbf{r}_\perp, t) \hat{\mathbf{z}} + F'_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \rho(\mathbf{r}_\perp, t) \Delta_\perp u \hat{\mathbf{z}} + \eta \Delta v(\mathbf{r}, t) + \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \quad (\text{I.2.6})$$

Un illustration schématique de ce terme se trouve fig. I.21

A.1.4 Equations Complémentaires

Le système se complète en écrivant l'incompressibilité du fluide entourant la membrane, soit

$$\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = 0 \quad (\text{I.2.7})$$

ainsi que l'équation de diffusion des protéines dans la membrane :

$$\frac{\partial \psi}{\partial t} = \Lambda \Delta_\perp \frac{\delta H}{\delta \psi} + \nabla_\perp \cdot \mathbf{f}_\psi \quad (\text{I.2.8})$$

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \nabla P(\mathbf{r}_\perp, t) - \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta H}{\delta u}(\mathbf{r}, t) \delta(z) \mathbf{e}_z$$

$$+ \boxed{F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z - w^\downarrow)] \Psi(\mathbf{r}, t) \mathbf{e}_z}$$

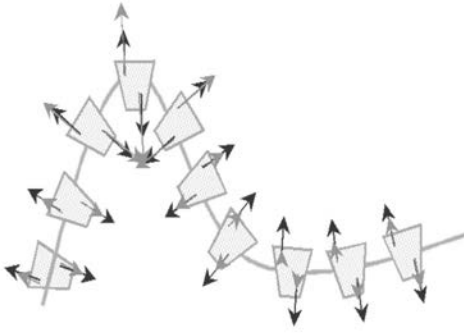
$$+ \boxed{F'_a \Delta_\perp u [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z - w^\downarrow)] \rho(\mathbf{r}, t) \mathbf{e}_z}$$


FIG. I.21 – Représentation schématique des deux derniers termes de l'équation de Stokes : les dipôles de force active non-dépendants et dépendants de la courbure.

où $\mathbf{f}_\psi$ est une contribution à l'équation de diffusion due au bruit thermique. On trouvera plus de détails sur le système dans son ensemble dans [Manneville et al., 2001; Girard, 2004].

A.2 Equations de Langevin, spectre de fluctuations et fonction d'autocorrélation temporelle des fluctuations

A.2.1 Equations de Langevin

Ce système d'équations conduit à un système d'équations de Langevin [Manneville, 1999; Manneville et al., 2001]. Nous ne détaillerons pas les calculs ici. Nous définissons la transformée de Fourier comme

$$f(\mathbf{q}_\perp, t) = \iint f(\mathbf{r}_\perp, t) \exp(i\mathbf{q}_\perp \cdot \mathbf{r}_\perp) d^2 \mathbf{r}_\perp \quad (\text{I.2.9})$$

Vient alors le système

$$\begin{cases} \frac{\partial u}{\partial t}(\mathbf{q}_\perp, t) + \tau_u^{-1} u(\mathbf{q}_\perp, t) = \beta \psi(\mathbf{q}_\perp, t) + \mu \\ \frac{\partial \psi}{\partial t}(\mathbf{q}_\perp, t) + \tau_\psi^{-1} \psi(\mathbf{q}_\perp, t) = \gamma u(\mathbf{q}_\perp, t) + \nu \end{cases} \quad (\text{I.2.10})$$

avec les variables suivantes ($\dot{a}$ le taux de pompage des protons et D_P le coefficient de diffusion effective du proton à la sortie de la pompe).

$$\begin{aligned}
 \tau_u^{-1} &= (\lambda_P + \frac{1}{4\eta q_\perp})(\sigma q_\perp^2 + \kappa q_\perp^4) + \rho \lambda_P F'_a q_\perp^2 - \frac{\rho \mathcal{P}'_a w}{4\eta} q_\perp^3 \\
 \tau_\psi^{-1} &= \Lambda \chi q_\perp^2 = D q_\perp^2 & \bar{F}_a &= F_a - 2kT\dot{a}/D_P q_\perp \\
 \beta &= \lambda_P \bar{F}_a - \mathcal{P}_a \frac{q_\perp w}{4\eta} - \Xi q_\perp^2 (\lambda_P + \frac{1}{4\eta q_\perp}) & \mathcal{P}_a &= F_a \frac{w_\uparrow^2 - w_\downarrow^2}{2w} \\
 \mu &= \lambda_P f_p(\mathbf{q}_\perp, t) + \frac{1}{2\pi\eta} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \hat{\mathbf{z}}}{q^2} dq_z & \mathcal{P}'_a &= F'_a \frac{w_\uparrow^2 - w_\downarrow^2}{2w} \\
 \gamma &= -\Lambda \Xi q_\perp^4 \\
 \nu &= -i \mathbf{q}_\perp \mathbf{f}_\psi(\mathbf{q}_\perp, t)
 \end{aligned} \tag{I.2.11}$$

Ce système sera la base de tous les calculs suivants. Il est complété par les valeurs des moyennes et fonction d'autocorrélation des forces stochastiques:

$$\begin{aligned}
 \langle f_{th}(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle &= 0 \\
 \langle f_{th}(\mathbf{r}_\perp, t) f_{th}(\mathbf{r}'_\perp, t') \rangle &= 2kT \lambda_P^{-1} \delta(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp) \delta(t - t') \\
 \langle \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \rangle &= 0 \\
 \langle f_{hi}(\mathbf{r}, t) f_{hj}(\mathbf{r}', t') \rangle &= 2kT \eta \{ -\delta_{ij} \nabla^2 + \partial_i \partial_j \} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t') \\
 \langle \mathbf{f}_\psi(\mathbf{r}_\perp, t) \rangle &= 0 \\
 \langle f_{\psi i}(\mathbf{r}_\perp, t) f_{\psi j}(\mathbf{r}'_\perp, t') \rangle &= 2\Lambda kT \delta_{ij} \delta(\mathbf{r}_\perp - \mathbf{r}'_\perp) \delta(t - t')
 \end{aligned} \tag{I.2.12}$$

A.2.2 Spectre de Fluctuation

On en déduit l'expression générale du spectre de fluctuations qui est en fait la fonction d'autocorrélation de u à temps égaux :

$$\begin{aligned}
 \langle u(\mathbf{q}_\perp, t) u(-\mathbf{q}_\perp, t) \rangle &= \frac{kT}{(\tau_u^{-1} + \tau_\psi^{-1})(\tau_u^{e-1} + \tau_a^{-1})} \\
 &\times \left[\frac{(\lambda_P F_a - \mathcal{P}_a \frac{q_\perp w}{4\eta})^2}{\chi} + (\tau_u^{-1} + \tau_\psi^{-1} - \tau_a^{-1})(\lambda_P + \frac{1}{4\eta q_\perp}) \right]
 \end{aligned} \tag{I.2.13}$$

avec

$$\tau_a^{-1} = \frac{\Xi}{\chi} q_\perp^2 \left(\lambda_P F_a - \mathcal{P}_a \frac{q_\perp w}{4\eta} \right)$$

Par ailleurs on trouve que la rigidité de courbure est renormalisée par la présence des protéines :

$$\kappa^e = \kappa - \Xi^2 / \chi \tag{I.2.14}$$

et le temps caractéristique des fluctuations fait apparaître les termes de dipôle de force

$$(\tau_u^e)^{-1} = (\lambda_P + \frac{1}{4\eta q_\perp})(\sigma q_\perp^2 + \kappa^e q_\perp^4) + \rho \lambda_P F'_a q_\perp^2 - \frac{\rho \mathcal{P}'_a w}{4\eta} q_\perp^3 \tag{I.2.15}$$

A.2.3 Fonction d'autocorrélation à temps inégaux

On peut aussi calculer la fonction d'autocorrélation à temps inégaux en suivant les calculs fait par D. Lacoste à partir du modèle présenté précédemment [Lacoste, 2004]. Si on suppose la force active et le dipôle de force hydrodynamique indépendant du temps, alors on obtient :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_\perp, t)u(-\mathbf{q}_\perp, 0) \rangle = & \frac{\langle \mu^2 \rangle}{2AB(\omega_1 - \omega_2)} [(A\omega_1 - \omega_\psi^2 \omega_2)e^{-\omega_1 t} - (A\omega_2 - \omega_\psi^2 \omega_1)e^{-\omega_2 t}] \\ & + \frac{\beta \langle \nu^2 \rangle}{2AB(\omega_1 - \omega_2)} [\omega_1 e^{-\omega_2 t} - \omega_2 e^{-\omega_1 t}] \end{aligned} \quad (\text{I.2.16})$$

où on a pris :

$$\omega_u = \tau_u^{-1} \quad \text{et} \quad \omega_\psi = \tau_\psi^{-1} \quad (\text{I.2.17})$$

$$\omega_1 = \frac{1}{2} \left(\omega_u + \omega_\psi + \sqrt{(\omega_u - \omega_\psi)^2 + 4\beta\gamma} \right) \quad (\text{I.2.18})$$

$$\omega_2 = \frac{1}{2} \left(\omega_u + \omega_\psi - \sqrt{(\omega_u - \omega_\psi)^2 + 4\beta\gamma} \right) \quad (\text{I.2.19})$$

$$A = \omega_u \omega_\psi - \beta\gamma \quad \text{et} \quad B = \omega_u + \omega_\psi \quad (\text{I.2.20})$$

Néanmoins on est dans un cas où on ne β , γ , ω_u et ω_ψ ne dépendent pas du temps. On se place maintenant dans le cas de [Prost and Bruinsma, 1996] où la force active comporte deux contributions. Celle constante que nous avons pris en compte précédemment et une contribution exponentielle dont le temps caractéristique τ_p est celui de pompage d'une protéine. Nous avons considéré jusqu'alors, suivant en cela [Manneville et al., 2001], que dans la fonction d'autocorrélation à temps égaux, cette seconde contribution est négligeable. Néanmoins, si on s'intéresse à la fonction d'autocorrélation en temps, ce terme doit être pris en compte. Il existe un cas simple lorsqu'il n'y a pas de couplage entre la courbure et la diffusion (soit $\Xi = 0$), on obtient :

$$\begin{aligned} \langle u(\mathbf{q}_\perp, t)u(-\mathbf{q}_\perp, 0) \rangle = & \langle \mu^2 \rangle \tau_u \exp\left(\frac{-t}{\tau_u}\right) \\ & + \frac{\beta_0^2 \langle \nu^2 \rangle}{\tau_u^{-1} \tau_\psi^{-1} (\tau_u^{-2} - \tau_\psi^{-2})} \left[-\tau_\psi^{-1} \exp\left(\frac{-t}{\tau_u}\right) + \tau_u^{-1} \exp\left(\frac{-t}{\tau_\psi}\right) \right] \\ & + \frac{\beta_1^2 \langle \nu^2 \rangle}{\tau_u^{-1} \tau_\psi^{-1} (\tau_u'^{-2} - \tau_\psi'^{-2})} \left[-\tau_\psi'^{-1} \exp\left(\frac{-t}{\tau_u}\right) + \tau_u^{-1} \exp\left(\frac{-t}{\tau_\psi'}\right) \right] \end{aligned} \quad (\text{I.2.21})$$

avec

$$\langle \beta(t) \rangle = \beta_0 \quad (\text{I.2.22})$$

$$\langle \beta(t)\beta(t') \rangle = \beta_0^2 + \beta_1 \exp \frac{-(t-t')}{\tau_p} \quad (\text{I.2.23})$$

et

$$\tau_\psi'^{-1} = Dq_\perp^2 + \frac{1}{\tau_p} \quad (\text{I.2.24})$$

où D est le coefficient de diffusion de la protéine dans la membrane.

A.3 Ordres de grandeur et conséquences

A.3.1 Ordre de grandeur des paramètres dans le cas de la bactériorhodopsine

On pourra se reporter pour plus de détails à [Manneville et al., 2001; Girard, 2004] où ces ordres de grandeurs sont aussi discutés.

La perméabilité des membranes lipidiques a été mesurée par des expériences de choc osmotique [Boroske and Elwenspoek, 1981; Jansen and Blume, 1995; Olbrich et al., 2000]. On évalue alors le coefficient de perméabilité Λ_p , qui rentre dans l'expression du volume V traversant la membrane en fonction de la différence de concentration Δc ; et on a alors $V = \Lambda_p v_{eau} \Delta c$ où v_{eau} est le volume molaire de l'eau ($v_{eau} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$). La force osmotique permettant le passage de l'eau peut être évalué à $\Delta \Pi = \Delta c RT$ et ainsi on en déduit $\lambda_p = \Lambda_p \frac{v_{eau}}{RT}$, soit $\lambda_p \simeq 10^{-13} - 10^{-12} \text{ m}^3/\text{N.s.}$

La viscosité des solutions peut être prise comme celle de l'eau pure compte tenu que les concentrations sont faibles soit $\eta = 10^{-3} \text{ kg/m.s.}$ Les tensions mesurées couramment (voir § B.1 p. 177) sont de l'ordre de $\sigma = 10^{-7} \text{ N/m}$, et les module de rigidité de courbure $\kappa = 10^{-19} \text{ J}$.

Le paramètre Ξ de couplage entre la courbure et la diffusion est plus subtil à estimer. On peut faire une estimation théorique, comme celle faite dans l'annexe B de [Manneville et al., 2001]. Il est montré que l'asymétrie de forme de la protéine n'est pas le paramètre qui contribue le plus pour la BR, car elle a une forme proche d'un cylindre. C'est le dipôle de la BR dans le champ électrique local dans la membrane du à la flexoélectricité qui va dominer et nous conduit à l'estimation $\Xi = wkT$, soit $\Xi \simeq 2 \times 10^{-29} \text{ J.m}$ (Cependant cette grandeur est mesurée à 10^{-28} J.m dans le cas de l'ATPase- Ca^{2+} [Girard, 2004]). Dans le cas de la bactériorhodopsine, les expériences de micropipettes [Manneville et al., 2001] n'ont pas permis de mesurer une renormalisation du module de rigidité de courbure κ . On peut noter aussi les effets sur le module de rigidité de courbure mesurés par Méléard et al. [Méléard et al., 1998] et [Gerbeaud, 1998, chapitre 5] mais la reconstitution de la protéine n'était pas du tout contrôlée dans ce cas.

Par ailleurs, on va estimer le dipôle actif $\mathcal{P}_a$ comme une fraction de l'énergie apportée par le photon dans une gamme vert jaune, soit $\mathcal{P}_a \simeq \frac{h\nu}{10} \simeq 10kT \simeq \kappa$. Pour la partie dépendant de la courbure, on estime que le taux de pompage est contrôlé par un facteur de Boltzmann, modifié par l'énergie nécessaire au déplacement du proton dans le champ issu de la flexoélectricité. Soit $\mathcal{P}'_a \simeq w\kappa$

On évalue par ailleurs $\chi \simeq \frac{kT}{\rho}$, où ρ est la densité surfacique totale de protéines.

Il faut noter toutefois que ces estimations ont été faites en utilisant les résultats des expériences de micropipettes [Manneville, 1999; Manneville et al., 2001] et que certains paramètres comme Ξ et P_a sont des grandeurs que nous espérons mesurer à l'aide de la technique d'analyse de contours.

A.3.2 Simplifications du spectre

Les vésicules que l'on observe ont un rayon de l'ordre de $10 \mu\text{m}$, soit $q_\perp > 10^5 \text{ m}^{-1}$. En supposant que la taille du dipôle est proche de l'épaisseur de la membrane, soit $\frac{\mathcal{P}_a}{F_a} \simeq w$, on arrive à

$$\lambda_p F_a \ll \frac{\mathcal{P}_a}{4\eta} q_\perp w \quad (\text{I.2.25})$$

On peut donc négliger le terme de perméation active devant le dipôle hydrodynamique actif pour les pompes. Par ailleurs, des ordres de grandeurs il vient

$$\lambda_p \ll \frac{1}{4\eta q_\perp} \quad (\text{I.2.26})$$

On négligera donc les termes de perméation. En négligeant ces termes, il vient le spectre de fluctuation dans le cas de la BR

$$\langle u(\mathbf{q}_\perp, t) u(-\mathbf{q}_\perp, t) \rangle \simeq \frac{kT}{\sigma q_\perp^2 + \tilde{\kappa}^e q_\perp^4} + \frac{kT [\mathcal{P}_a^2 w^2 + \Xi \mathcal{P}_a w]}{\chi (\sigma + \tilde{\kappa} q_\perp^2) (\sigma + \tilde{\kappa}^e q_\perp^2)} \quad (\text{I.2.27})$$

où $\tilde{\kappa}^e = \tilde{\kappa}^e - \mathcal{P}_a w \Xi / \chi$ et $\tilde{\kappa}^e = \kappa^e - \rho \mathcal{P}_a w$ et une relation similaire entre $\tilde{\kappa}$ et κ .

C'est donc ce spectre qu'on s'attend à mesurer. Il est composé de deux parties : une première partie correspondant à un spectre similaire aux membranes passives où le module de courbure est renormalisé et une nouvelle contribution qui fait apparaître l'activité de la protéine. On s'attend donc, d'après ce modèle, à mesurer un nouveau spectre de fluctuations et à observer une amplification des fluctuations due à l'activité des protéines. On peut à l'aide des ordres de grandeur proposés précédemment faire une simulation des spectres attendues, qu'on trouvera fig. I.22. On remarque qu'à ce stade la différence entre membrane active et membrane passive paraît faible. Néanmoins nous verrons au § A.1.1 p. 182 que la différence est plus marquée dans nos conditions d'observation.

B. Mise en évidence expérimentale préexistante

La première mise en évidence expérimentale de l'effet de l'activité d'une protéine sur les fluctuations a été réalisée sur la bactériorhodopsine à l'aide d'une expérience de micropipette [Manneville, 1999; Manneville et al., 2001].

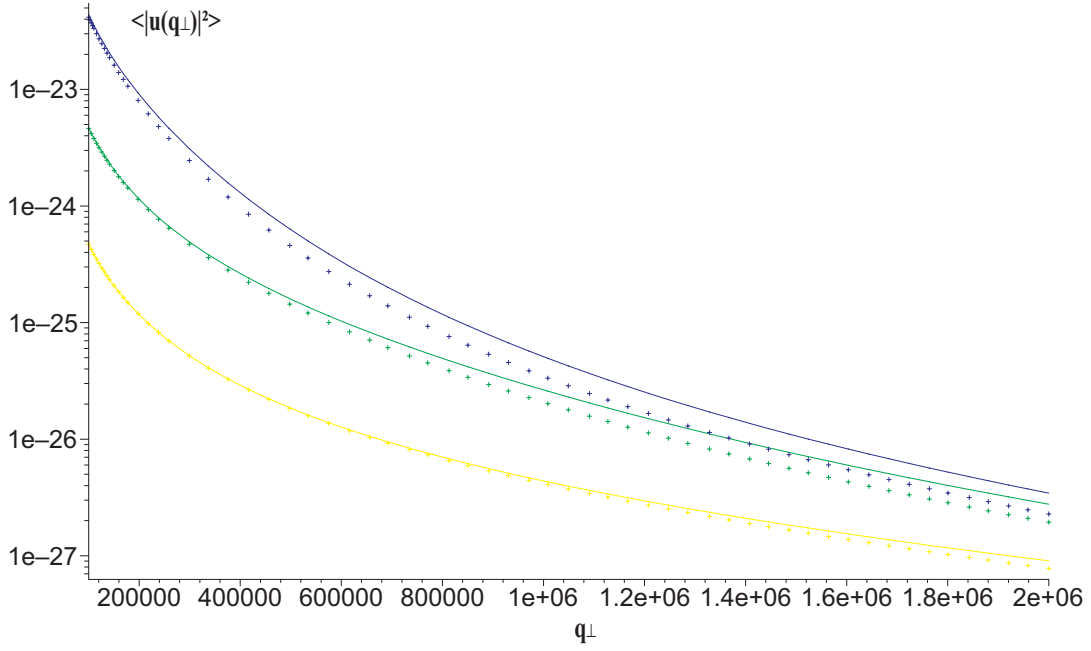


FIG. I.22 – Simulation du spectre de fluctuation attendu pour une vésicule active (ligne) et une vésicule passive (point). La tension varie de $\sigma = 10^{-8} N/m$ pour les courbes bleues, $\sigma = 10^{-7} N/m$ pour les courbes verte, et $\sigma = 10^{-6} N/m$ pour les courbes jaunes. Les autres paramètres ont été fixé théoriquement à l'aide des estimations du § A.3 p. 47. On a la taille caractéristique du dipôle de force hydrodynamique fixée à $w = 5 \times 10^{-9} m$, le module de rigidité de courbure à $\kappa = 4 \times 10^{-20} J$, la concentration surfacique de protéines $\rho = 10^{16} m^{-2}$, et la valeur du dipôle de force $P_a = 4 \times 10^{-20} J.m$.

B.1 Principe de la technique de micropipettes

Ces expériences consistent à défroisser une vésicule lipidique en l'aspirant avec une micropipette et à mesurer l'excès de surface par l'intermédiaire de la longueur de la «langue» aspirée. Cette méthode permet de fixer la tension en contrôlant la pression d'aspiration. Une telle expérience a l'avantage de donner une mesure de l'intégrale du spectre de fluctuation sur toutes les valeurs de $q_{\perp}$, même très en-dessous de la résolution optique ; cela permet d'avoir une grande sensibilité et de mesurer des effets faibles sur les fluctuations. Cependant, cette technique ne permet pas de mesurer directement le spectre de fluctuations mais seulement une température effective.

On se reportera à la fig. I.23 pour une illustration de l'expérience.

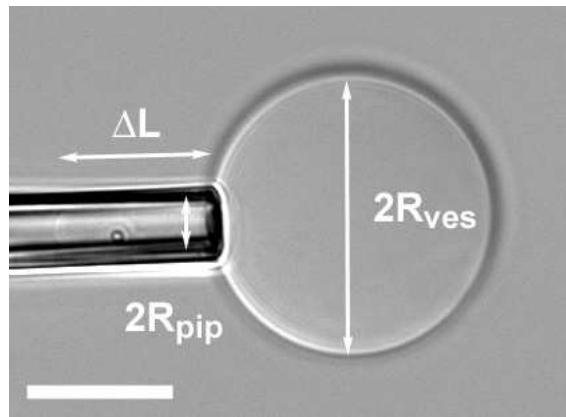


FIG. I.23 – Une image d'une vésicule de EPC . La longueur de la «langue» aspirée dans la micropipette permet de remonter à l'excès de surface défroissé par aspiration. L'image est prise en DIC (voir [Inoué and Spring, 1997, pp. 89 sq.]). La barre représente $10\mu\text{m}$ (d'après [Roux, 2003]).

Si R_v est le rayon initial de la vésicule, R_p le rayon intérieur de la micropipette, ΔP la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la micropipette, et ΔL la longueur de la langue, on a alors les expressions suivantes [Evans and Rawicz, 1990]: pour la tension

$$\sigma = \frac{\Delta P R_p}{2 \left(1 - \frac{R_p}{R_v} \right)} \quad (\text{I.2.28})$$

et pour la dilatation d'aire

$$\alpha = \frac{\Delta S}{S} = \Delta L \frac{\left(\frac{R_p}{R_v} \right)^2 - \left(\frac{R_p}{R_v} \right)^3}{2R_p} \quad (\text{I.2.29})$$

On se reportera à [Manneville, 1999; Manneville et al., 2001] pour plus de détails sur la mise en oeuvre de l'expérience.

B.2 Résultats dans le cas de la BR

B.2.1 Excès de surface prédit par la théorie

L'excès de surface α est relié au spectre de fluctuation de la façon suivante [Helfrich and Servuss, 1984] :

$$\alpha = \langle (\nabla_{\perp} u)^2 / 2 \rangle = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_0^{q_{max}} \frac{1}{2} q_{\perp}^2 \langle u(\mathbf{q}_{\perp})^2 \rangle 2\pi q_{\perp} dq_{\perp} \quad (\text{I.2.30})$$

Lorsqu'on va appliquer cette équation dans notre cas, nous ne pourrons pas mesurer l'ensemble des paramètres du système compte tenu que nous n'accédons qu'à l'intégrale du spectre de fluctuation. En conséquence, l'équation obtenue peut se mettre sous la même forme que dans le cas passif en changeant simplement la température par une température effective qui dépend des paramètres du système. On obtient donc :

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{kT^{eff}}{8\pi\kappa^e} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right) \quad (\text{I.2.31})$$

avec

$$\frac{T^{eff}}{T} = \frac{\kappa^e}{\tilde{\kappa}^e} \left(1 + \frac{\mathcal{P}_a^2 w^2 - \Xi \mathcal{P}_a w}{\tilde{\kappa} \chi} \right) \quad (\text{I.2.32})$$

On notera la présence du module de rigidité de courbure renormalisé par la présence de la protéine (à cause du couplage courbure-diffusion) dans l'équation ; en effet bien que dans le cas de la BR Manneville et al. ne voit pas d'effet, nous verrons que pour d'autres protéines, il est visible. Cette équation a permis d'interpréter les résultats des expériences de micropipette à partir de la mesure de la pente de $\ln \sigma$ le logarithme de la tension en fonction de l'écart de dilatation d'aire par rapport à un état de référence $\Delta\alpha$, soit $\frac{8\pi\kappa^e}{kT_{eff}}$.

B.2.2 Valeurs obtenue expérimentalement

Expérimentalement, J.-B. Manneville a observé une amplification des fluctuations due à l'activité de la bactériorhodopsine. De façon simple, on peut visualiser cet effet en comparant l'excès de surface mesuré à une tension donnée pour la membrane passive et la membrane active (voir fig. I.24). L'ensemble des expériences a permis à J.-B. Manneville de montrer que la température effective de la membrane active était environ deux fois plus élevée que sa température thermodynamique. Par ailleurs, il n'a pas observé d'effet de la concentration en protéines (voir [Manneville et al., 2001]). Ce résultat est cohérent avec l'estimation venant des ordres de grandeurs (certains paramètres ont été ajustés à partir des résultats expérimentaux, mais restent dans une gamme pertinente). On obtient, pour la gamme de concentration estimée, d'après I.2.32 :

$$1.7 \lesssim \frac{T^{eff}}{T} \lesssim 2.3$$

C'est aussi sur ce système de GUVs contenant la BR que nous allons utiliser une autre technique permettant de mesurer le spectre de fluctuation. Ceci nous permet

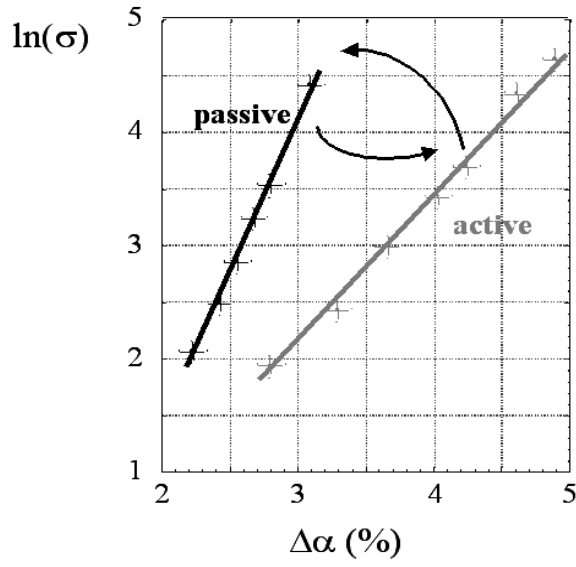


FIG. I.24 – Effet de l'activité de la protéine sur les fluctuations. La mesure de la variation du logarithme de la tension $\ln \sigma$ en fonction de l'excès d'aire relatif $\Delta\alpha$ suivant que la membrane soit passive (en noir) ou active (en gris) permet une mesure de la température effective. La pente est égale à $\frac{8\pi\kappa^e}{kT_{eff}}$ pour la membrane active et $\frac{8\pi\kappa^e}{kT}$ pour la membrane passive (d'après [Manneville, 2000]).

d'une part de tester les résultats de ces premières expériences et d'autre part une comparaison plus précise avec la théorie.

B.3 Expérience de micropipette sur la ATPase- Ca^{2+}

Des expériences ont été réalisées récemment au laboratoire par P. Girard. Il a étudié une protéine capable de pomper des ions, l'ATP-ase Ca^{2+} qui en hydrolysant de l'ATP va permettre le passage de deux ions Calcium d'un coté à l'autre de la membrane. Une amplification des fluctuations encore plus importante a été mesurée avec cette protéine [Girard, 2004]. En effet, la température effective obtenue est $T_{eff} \simeq 3T$. Dans le cas de cette protéine, l'amplitude des changements de conformation liés au pompage est de l'ordre de $40 \text{ \AA}$ [Toyoshima et al., 2000], beaucoup plus important que pour la BR ($3.5 \text{ \AA}$). Le dipôle hydrodynamique a pu être mesuré (et non évalué comme dans les équations de J.-B. Manneville) et est égal à $8kT$. Cette protéine est beaucoup plus volumineuse que la BR ce qui peut expliquer que la renormalisation du module de rigidité de courbure par la protéine ait pu aussi être mesurable.

C. Vers l'analyse de contour

A ce stade, les effets de l'activation de pompes ioniques a déjà pu être mis en évidence par la technique de micropipette. Il est cependant intéressant de développer une autre technique, moins perturbative que celle des micropipettes et qui permette une mesure indépendante de ces effets et plus encore, du spectre de fluctuation. Ceci constitue le but de cette thèse. Pour cela, afin d'aller au-delà des résultats obtenus par les micropipettes, nous avons développé une méthode de mesure du spectre de fluctuation ainsi que de la fonction d'autocorrélation temporelle à partir de l'analyse en temps réel du contour de vésicules géantes; dans une première partie nous présenterons en détail la technique de reconnaissance de contours qui a été développée et en particulier les raffinements apportés aux techniques existantes (le chapitre II.1 p. 57 donnera un aperçu des techniques développées auparavant, les chapitres II.2 p. 77 et II.3 p. 105 exposeront la technique développée). Nous détaillerons le système expérimental au chapitre III.1 p. 131. Par ailleurs une nouvelle méthode de reconstitution de la BR en protéoliposomes géants a été mise en place permettant la préparation de liposomes avec une concentration contrôlée et homogène de protéines (chapitre III.2 p. 139). Puis les expériences faites sur les vésicules purement lipidiques permettant de tester notre méthode d'analyse de contours seront présentées (chapitre III.3 p. 167). Et enfin les expériences faites sur les membranes actives à l'aide de cette technique (chapitre III.4 p. 181).

Deuxième partie

Techniques de reconnaissance de contours

Chapitre II.1

Mesure du spectre de fluctuations et des fonctions d'autocorrélation : historique et état de l'art



CE CHAPITRE va nous permettre d'avoir un aperçu des techniques qui ont été développées depuis les travaux pionniers de Brochard et Lenon pour mesurer les spectres de fluctuation et/ou les fonctions d'autocorrélation [Brochard and Lennon, 1975], jusqu'aux récentes publications par Méléard et al. [Pott and Méléard, 2002] et Döbereiner et al. [Döbereiner et al., 2003]. Nous allons passer en revue les étapes marquantes du développement de cette technique avec leurs principales caractéristiques, sans toutefois viser à l'exhaustivité. En effet de nombreux travaux ont été réalisés depuis les 30 dernières années ; les progrès de ces techniques sont aussi fortement liés aux progrès des caméras et des ordinateurs sur la même période.

A. Premières applications de l'analyse d'images à l'analyse des fluctuations

A.1 Travaux sur les globules rouges

Les travaux de Brochard et al. sur le scintillement du globule rouge [Brochard and Lennon, 1975] ont permis de montrer pour la première fois que ce phénomène était dû aux fluctuations de membrane. C'est aussi la première utilisation d'une technique d'analyse d'images dans l'étude des fluctuations. En effet, les auteurs ont montré que si on supposait que ces globules avaient une tension de surface faible et que leur forme était due à l'énergie de courbure de la membrane dans des conditions physiologiques (voir fig. II.1), on pouvait alors relier les fluctuations d'épaisseur du globule rouge à celles de la membrane.

Sur le plan de la technique de reconnaissance de contours, ils utilisent une image

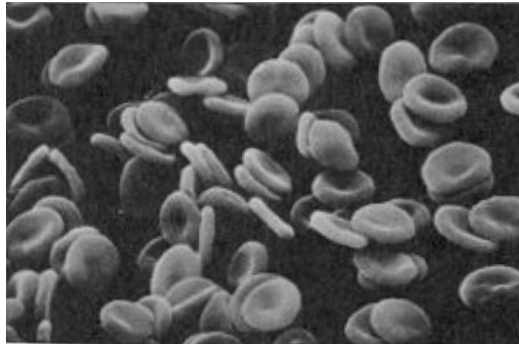


FIG. II.1 – *Image en contraste de phase de globules rouges dans des conditions physiologiques (d'après [Alberts et al., 1989]).*

en contraste de phase du globule rouge et relie l'intensité en un point de celui-ci directement à son épaisseur. Ainsi ils ont alors mesuré les fonctions d'autocorrélation temporelle et de corrélation à deux points.

A.2 Travaux sur les vésicules géantes

A.2.1 Détection de quelques points particuliers du contour

Les premières expériences sur les vésicules lipidiques géantes ont été faites par Webb et al. [Schneider et al., 1984]. A l'aide d'une membrane lipidique marquée par un analogue de lipide fluorescent, les auteurs peuvent accéder à la position de la membrane au cours du temps en huit points de la vésicule. Dans cette première expérience de reconnaissance de contours proprement dite, la membrane est localisée comme le point de plus grande pente dans le profil de niveau de fluorescence pris perpendiculairement à la membrane (voir fig. II.2). De là, les auteurs tirent les fonctions d'autocorrélation en temps des fluctuations qu'ils relient au modèle de membrane disponible à l'époque où la membrane est représentée par un fluide à deux dimensions dans un milieu à bas nombre de Reynolds (comme l'eau à cette échelle) et qui peut être considéré comme visqueux ; ce modèle peut être ici assimilé au modèle standard de courbure (voir § B.1.2 p. 11 ou le tableau I.2 p. 15).

A.2.2 Détection de portions de contours

L'étape suivante est la détection de portions de contours. C'est ainsi que Bivas et al. [Bivas et al., 1987] proposent une détection de deux arcs du contour en DIC. A cause de l'absence de symétrie de révolution de l'image en DIC, y compris pour un objet possédant une symétrie de révolution, il n'est effectivement possible d'accéder qu'à une portion du contour (voir fig. II.3 p. 60). La position du contour est déterminée par le point moyen entre le point d'intensité maximale et le point d'intensité

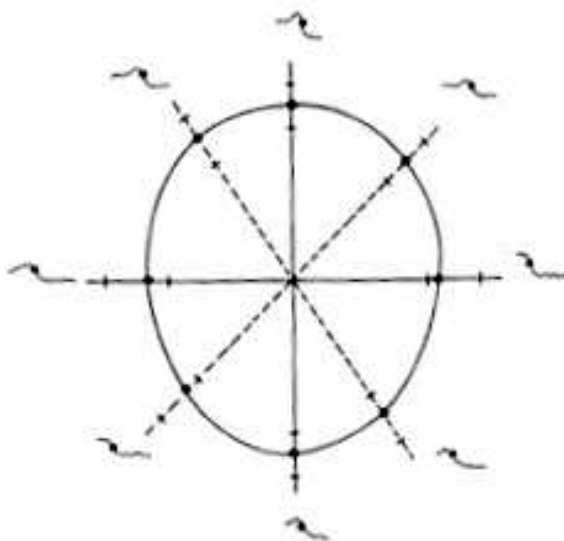


FIG. II.2 – *Vision schématique de la reconnaissance de 8 points du contour de GUVs par la technique développée par Webb et al. Les points sont localisés comme l'endroit de plus grande pente sur le profil d'intensité de fluorescence de la membrane contenant un marqueur fluorescent, profil pris perpendiculairement à la membrane (d'après [Schneider et al., 1984]).*

minimale pris sur le profil des niveaux d'intensité le long d'une ligne horizontale coupant le contour. On peut noter que cette détection qui est limitée par l'asymétrie de l'image en DIC évoquée précédemment, n'est pas encore une forme évoluée d'algorithme permettant de prendre la membrane dans n'importe quelle position, mais un système où la membrane ne doit pas former un angle trop grand avec l'axe vertical. Par contre commence le développement de techniques qui auront une sophistication croissante pour identifier la position de la membrane.

En ce qui concerne les méthode d'analyse des résultats, le modèle en harmoniques sphériques est introduit avec, à ce moment : là, le simple modèle de courbure spontanée (voir § B.1.2 p. 11 ou le tableau I.2 p. 15), et permet d'interpréter les résultats grâce à la fonction d'autocorrélation spatiale.

B. Vers des méthodes plus fines

Avec les progrès des ordinateurs va commencer à la fin des années 80 l'essor des techniques de reconnaissance de contours et d'analyse des fluctuations. Trois groupes vont dominer la technique de reconnaissance de contours proprement dite : Bivas, Faucon, Méléard et al. d'une part, Sackmann et al. d'autre part et enfin Döbereiner et al. Il est resté bien entendu de la place pour d'autres contributions dont certaines seront mentionnées dans ce qui va suivre.

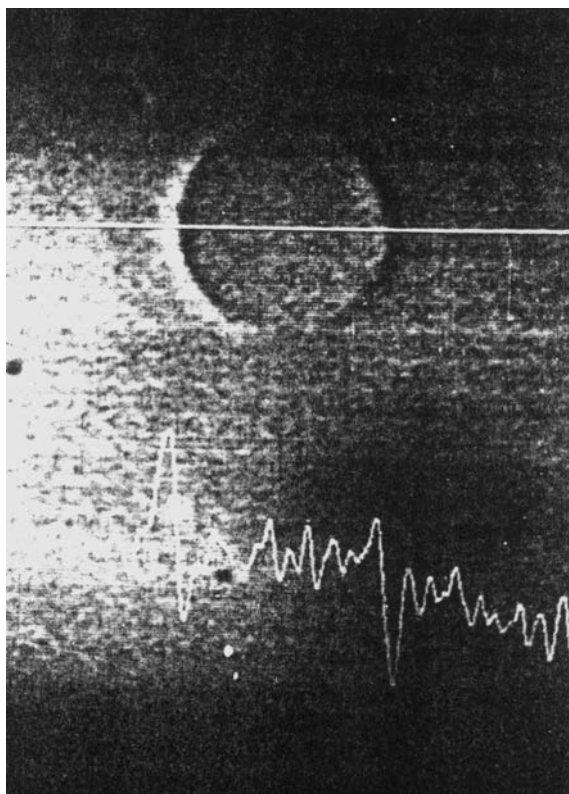


FIG. II.3 – Vue d'une vésicule en DIC après un filtre de lissage de l'image (*smoothing*), avec en dessous le profil en niveau de gris qui va permettre la reconnaissance (d'après [Bivas et al., 1987]).

B.1 Analyse des fluctuations

B.1.1 Diffusion des objets eux-mêmes

Des expériences de diffusion de lumière par les globules rouges ont continué sur les traces des travaux de Brochard et al. [Brochard and Lennon, 1975] ; on peut citer par exemple les expériences faites sur le scintillement des globules rouges en fonction des conditions expérimentales (vieillesse des globules, osmolarité, et pathologie des globules) dans le groupe de Sackmann [Fricke and Sackmann, 1984; Fricke et al., 1986].

B.1.2 Fluctuation locale de la membrane d'un objet

Autour de S. Levin s'est développée l'étude des fluctuations de différents globules et cellules, et notamment des fluctuations en temps observées en un point. L'étude se fait par diffusion de lumière sur une petite surface de l'objet [Krol et al., 1989; Krol et al., 1990; Levin and Korenstein, 1991] dans un dispositif expérimental de type fond noir (voir [Inoué and Spring, 1997, pp. 70 sq.]). Les auteurs proposent que le phénomène de fluctuations de la paroi des cellules est général à toutes les cellules. Par ailleurs, leurs mesures permettent de mettre en évidence pour la première fois une contribution de l'activité du réseau de spectrine^a aux fluctuations (voir fig. II.4). A ce stade, les auteurs s'étaient contentés de l'étude de l'influence des conditions expérimentales sur les fluctuations.

Différents types cellulaires ont été étudiés par cette technique pour montrer le caractère général des fluctuations et aussi de façon intéressante, le rôle de l'activité cellulaire dans ces fluctuations [Mittelman et al., 1991; Mittelman et al., 1994; Tuvia et al., 1997]. Toutefois peu d'améliorations ont été apportées à cette technique au cours du temps.

B.2 Analyse de la forme du globule rouge

Les méthodes vues précédemment permettent de mesurer la composante temporelle des fluctuations. Nous allons maintenant nous intéresser au spectre de fluctuations et aux fonctions d'autocorrélation spatiales. Une méthode a été développée dans [Peterson et al., 1992] pour mesurer l'amplitude des fluctuations localement le long d'une ligne horizontale diamétrale du globule rouge. Cette méthode peut être vue comme un raffinement des méthodes optiques qui mesuraient le scintillement par diffusion de lumière. La nouveauté consistait à mesurer les fluctuations d'intensité, en fonction de la position sur une ligne diamétrale du globule rouge. On peut noter aussi dans ce travail la séparation d'une image vidéo standard en ses deux demi-frames comme nous le ferons nous-même dans le même cas afin d'obtenir des fonctions de corrélation en temps correctes, c'est à dire avec tous les points acquis

a. Il s'agit du cytosquelette du globule rouge ; c'est un réseau dynamique constamment en train de créer des nœuds et d'en détruire.

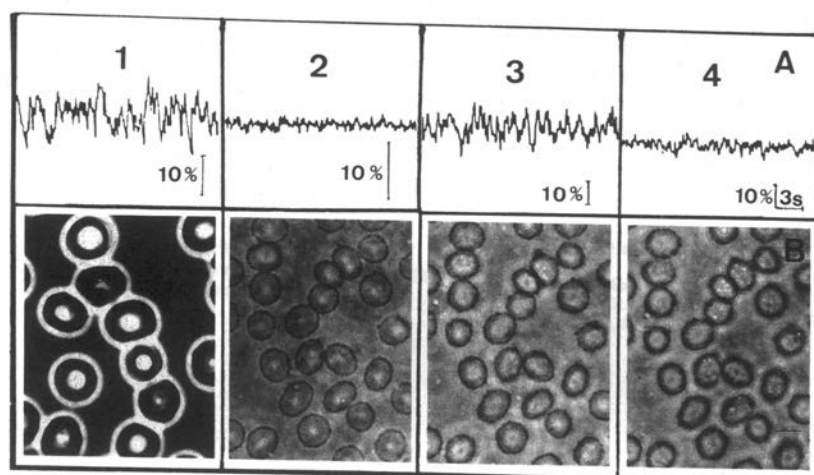


FIG. II.4 – La ligne A, montre les fluctuations d'intensité pour des globules rouges dans diverses conditions; pour chacune des courbe on fait correspondre une image en contraste de phase dans la ligne B. 1. Globules rouges natifs, 2. Ghosts^c dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) après un traitement à la saponine à 0.005% 3. Ghosts dans du PBS avec 2 mM de MgATP 4. Ghosts dans du PBS après avoir rincé le MgATP (d'après [Levin and Korenstein, 1991]).

sur le même laps de temps (pour plus de détails sur cet aspect voir § A.2.1 p. 84). On obtient ainsi des tracés d'amplitudes de fluctuation en fonction du point (voir fig. II.5), qui peuvent être comparés aux prédictions théoriques faites ici avec les modèles de courbure spontanée ou de courbure globale (*Bilayer Coupling*) (voir aussi § B.1.2 p. 11 ou le tableau I.2 p. 15).

Lors de cette étude, les mêmes auteurs ont amélioré leur technique pour aller vers une technique utilisant comme nous le halo du contraste de phase, mais d'une manière encore simple [Strey et al., 1995]. En effet le globule est toujours observé en contraste de phase mais la position de la membrane est maintenant déterminée comme le maximum d'intensité du halo (voir fig. II.6). Nous verrons dans les chapitres suivants les problèmes qu'une telle détermination peut poser. Néanmoins cela a permis d'accéder à la position de la membrane en fonction du temps en quatre points et pour la première fois de faire une décomposition des fluctuations en mode de Fourier (ici, bien sûr avec quatre points, seuls les modes 0,1 et 2 sont accessibles). Mais le fait d'avoir cette détection en temps réel permet d'accéder aussi aux fonction d'autocorrélations en temps. On ne parle plus ici du scintillement, mais bien de la position de la membrane, ce qui nous permet de remonter à des propriétés physiques (module de rigidité de courbure et module de compressibilité) comme le font les auteurs.

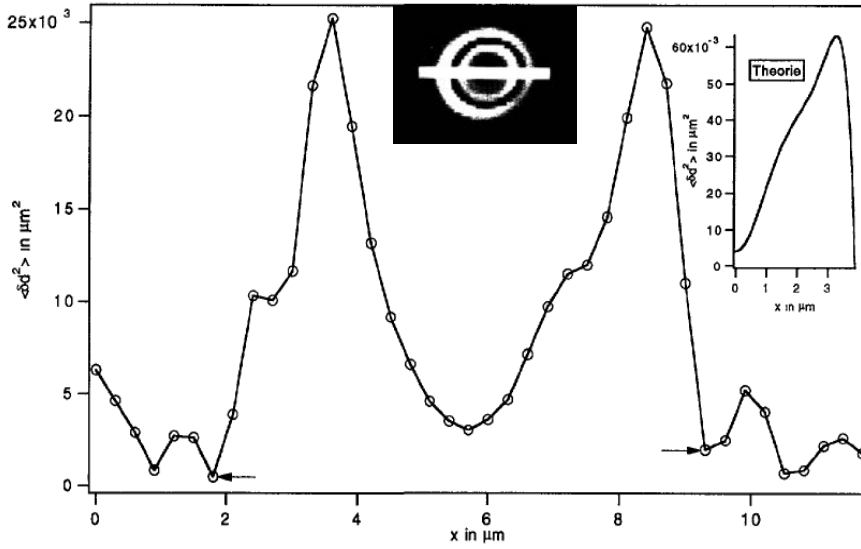


FIG. II.5 – Amplitude de scintillement d'un globule rouge (à relier à l'amplitude de fluctuation) en fonction de la position le long d'un de ses diamètres. Le globule rouge est ici dans une solution à 200 mOsmol. L'encart central est une image dans les mêmes conditions du globule rouge en contraste de phase, avec la bande blanche qui représente la zone utilisée dans le calcul de l'amplitude des fluctuations. L'encart à droite représente la prédiction théorique pour l'amplitude de fluctuation en fonction de la position le long d'un rayon du globule rouge (d'après [Peterson et al., 1992]).

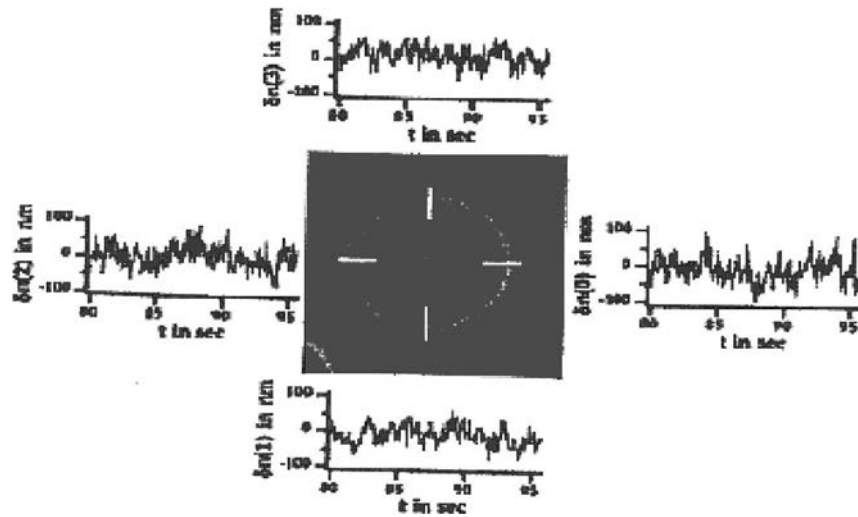


FIG. II.6 – La position de la membrane du globule rouge est mesurée simultanément en quatre points. La position de la membrane en fonction du temps telle qu'elle est détectée pour chaque point (d'après [Strey et al., 1995]).

B.3 Analyse de contours complets de vésicules géantes

Parallèlement à ces expériences sur les globules rouges se sont développées des expériences sur les vésicules lipidiques géantes; c'est cet aspect que nous allons maintenant aborder.

B.3.1 Diverses méthodes de reconnaissance développées par le groupe de E. Sackmann

Procédés de reconnaissance de contours utilisés Dans une première version de l'algorithme, l'image en contraste de phase de la vésicule est enregistrée. Après sans doute un lissage de l'image (*smoothing*) pour supprimer du bruit, l'algorithme choisit comme points du contour les points d'intensité minimale (voir fig. II.7) [Engelhardt et al., 1985]. L'acquisition se faisait alors à 2 images par seconde. Il s'agit là d'une des premières expériences où le contour est reconnu complètement.

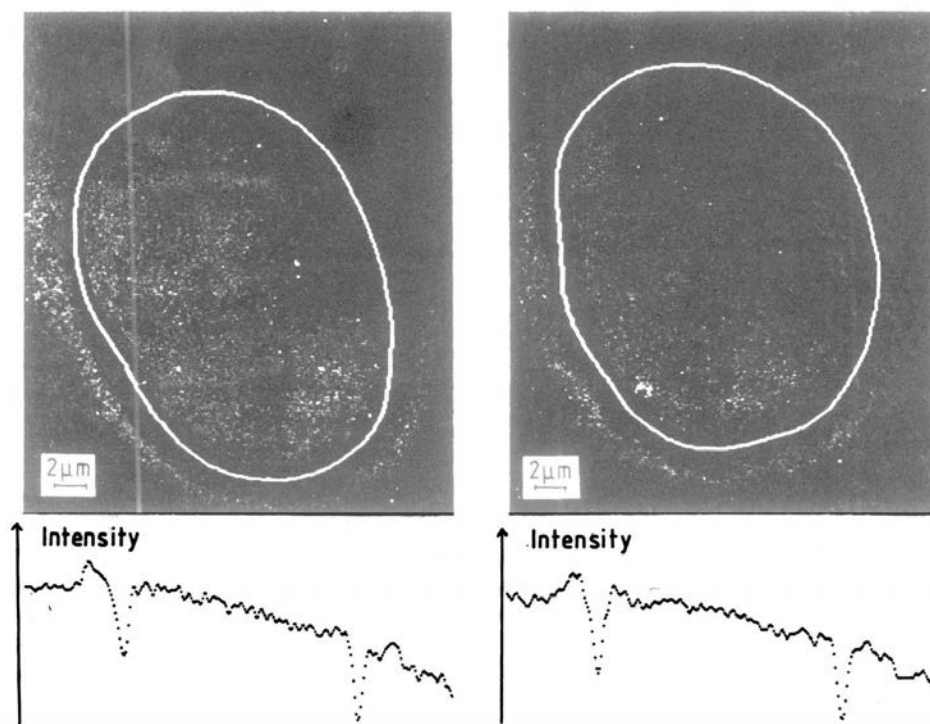


FIG. II.7 – Vésicule composée de 94 % de DMPC et de 6 % de Cholestérol prise à deux instants différents en contraste de phase. On a représenté en blanc les contours reconnus. Dessous est représenté le profil de niveau de gris le long d'une ligne horizontale coupant la vésicule. La position de la membrane est assignée aux minima d'intensité (d'après [Engelhardt et al., 1985]).

Ce procédé a ensuite été amélioré en réalisant une sommation sur plusieurs pixels voisins. On s'affranchit ainsi de lissage de l'image ou des artefacts dus à la présence de plusieurs minima comme on le voit fig. II.25 p. 97 [Duwe et al., 1990]. La détection se fait alors de proche en proche en recherchant à partir du point précédent, le point poursuivant la direction de progression du contour (déterminée à partir des points précédents) ou un point dans la direction diagonale à droite ou à gauche ; le choix entre ces trois points se fait en déterminant celui qui donne l'intensité la plus faible, lorsque celle ci est sommée sur 46 pixels voisins formant une sorte de flèche dans la direction prise par le contour (voir fig. II.8). Il faut toutefois noter que cette somme va masquer les fluctuations de courte longueur d'onde ; toutefois l'acquisition se fait à une cadence de 5 à 10 images par seconde et donc par conséquent, les fluctuations de longueur d'onde courte sont inaccessibles car elles ont des temps de vie plus courts que le temps d'intégration de la caméra (voir § B.1.6 p. 119).

Enfin un ultime développement est l'utilisation d'une reconnaissance en deux étapes [Häckl et al., 1997]. Lors de la première, une ébauche du contour est tracée à partir d'une détection par le minimum d'intensité à peu près similaire aux précédentes. Ensuite on prend le profil de niveau de gris le long d'une ligne perpendiculaire au contour reconnu. celui-ci est lissé de manière gaussienne, c'est à dire que l'intensité est recalculée comme étant

$$I(x, y) \propto \sum_{i,j=0}^{n_i, n_j} I_{i,j} \exp \left(-\frac{(x-i)^2 + (y-j)^2}{N^2} \right) \quad (\text{II.1.1})$$

avec $I_{i,j}$ l'intensité sur la grille de pixel au niveau de la i-ième ligne et la j-ième colonne, et $I(x, y)$ l'intensité sur l'image après lissage (voir fig. II.9 p. 67). Cette méthode a l'avantage de se placer toujours perpendiculairement à la membrane, néanmoins, le lissage de l'image empêche de détecter les petites fluctuations ; toutefois la limitation est ici encore le temps d'intégration de la caméra par rapport à la durée de vie des fluctuations.

Analyse des contours Le contour est «projeté» sur les harmoniques sphériques, en supposant que la forme de la vésicule est proche de la forme sphérique. On regarde en fait la projection sur les séries de Fourier de la coupe diamétrale de la vésicule par le plan focal (les projections sur les harmoniques sphériques et sur les séries de Fourier se calculent de manière analogue au § B.1.4 p. 115). Cette analyse a été introduite dès les premières expériences [Engelhardt et al., 1985] et restera la même dans les études suivantes [Duwe et al., 1990; Häckl et al., 1997]. Pour chaque mode, la valeur des fluctuations est associée à une valeur du module de rigidité de courbure ; ainsi il ne reste qu'à prendre la moyenne des valeurs trouvées pour chaque mode.

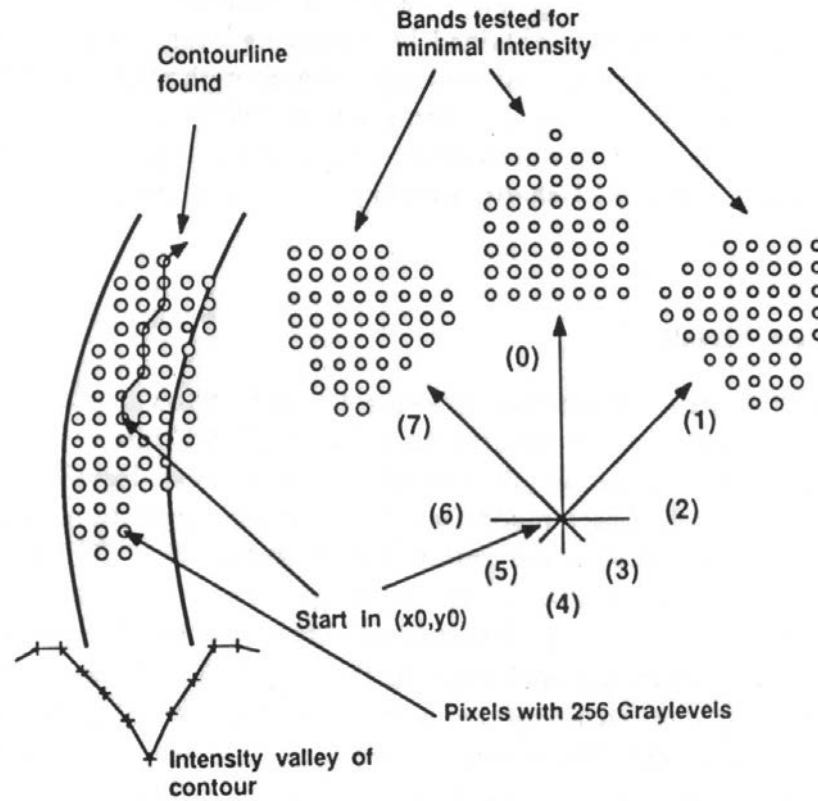


FIG. II.8 – Représentation schématique de l'algorithme utilisé par Duwe et al. pour la reconnaissance de contours. Le détection se fait de manière itérative. A partir d'un point et de la direction précédente, trois directions sont possibles : tout droit (noté 0), légèrement à droite (1) ou légèrement à gauche (7). Sur chacune de ces directions, une moyenne des niveaux d'intensité est calculée sur une bande (en forme de flèche) recouvrant les points voisins, avec à la base le point testé. Le point (0,1, ou 7) qui donnera les valeurs les plus faibles sera pris comme point suivant. Le contour suit ainsi la vallée dans la nappe représentant les niveaux de gris de chaque point de l'image (d'après [Duwe et al., 1990]).

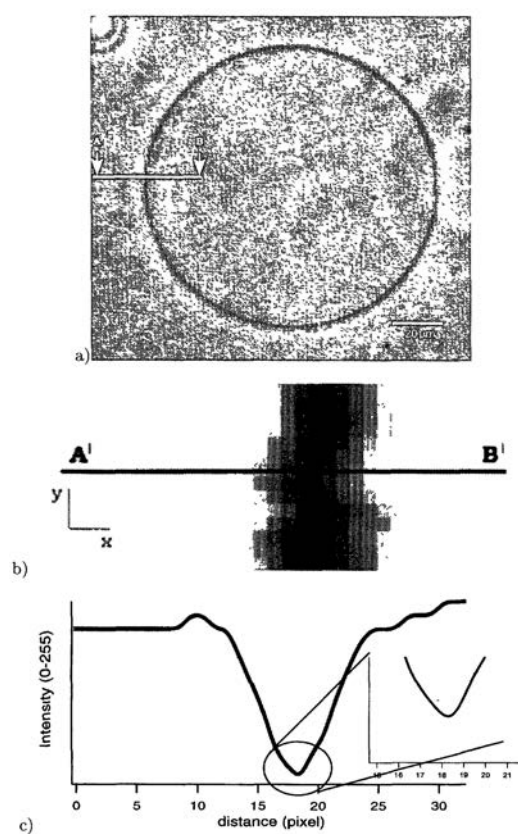


FIG. II.9 – a) Vésicule géante de DMPC observée en microscopie à contraste de phase, b) zoom sur la région du segment AB, c) profil de niveaux de gris obtenu après le lissage gaussien de l'image. (d'après [Häckl et al., 1997])

B.3.2 Méthode développée le groupe de Bordeaux (Faucon, Bivas et Méléard)

Procédés de reconnaissance de contour utilisés Les auteurs utilisent une image dont on a soustrait une image du fond afin de gommer les hétérogénéités, puis un profil est pris le long d'un rayon de la vésicule et la position du contour est identifiée comme la zone de 5 pixels contiguës d'intensité minimale. Une moyenne est calculée sur ces cinq points pour obtenir en coordonnées polaires le rayon depuis le centre choisi (probablement par l'utilisateur dans la phase d'initialisation de l'algorithme). Pour ce travail, la fréquence d'acquisition des contours est une image par seconde. On peut voir un exemple des résultats obtenus fig. II.10. A cette étape on en est encore à une simple mesure du module de rigidité de courbure.

Une amélioration notable a été le contournement du problème du temps d'in-

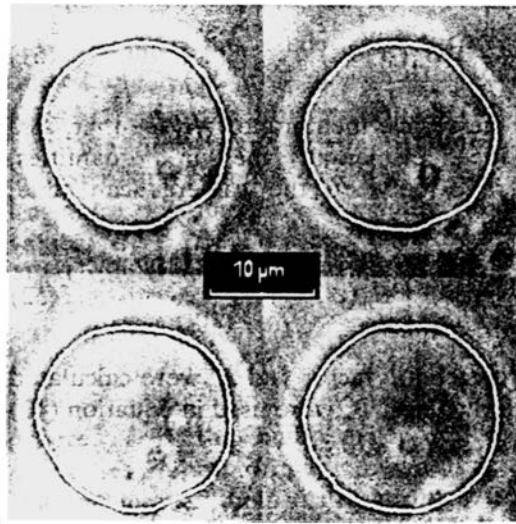


FIG. II.10 – Vésicule géante de EPC observées en microscopie à contraste de phase, avec superposé en blanc le contour obtenu (d'après [Faucon et al., 1989]).

tégration de la caméra en éclairant les vésicules avec une lumière pulsée [Méléard et al., 1992]. Le fait que cette lumière dure un temps bien plus bref que le temps d'intégration de la caméra permet de le «ramener» de cette manière à des valeurs plus petites. En effet on ne prend en compte l'intégration que sur la période éclairée du laps de temps où la caméra intègre. Cela évite la nécessité d'un terme correctif pour le temps d'intégration comme il a été introduit avant. Malheureusement, considérant la sensibilité de la caméra, il faut sommer le signal sur plusieurs pixel pour obtenir un signal appréciable, pouvant permettre une analyse. Ainsi on ne peut pas accéder aux fluctuations de petite longueur d'onde, devant choisir entre résolution en temps et résolution spatiale. C'est pourquoi dans notre cas, comme on le verra, nous préférons prendre en compte le temps d'intégration dans notre analyse et introduire ainsi un facteur correctif, ce qui est valable pour des fluctuations ayant un temps de vie du même ordre de grandeur que le temps d'intégration de la caméra

(pour des fluctuations beaucoup plus courtes, la méthode de prise en compte du temps d'intégration n'est pas correcte).

Dans le même temps l'algorithme a évolué vers à une détection en deux temps [Mitov et al., 1992]. Dans un premier temps un contour est détecté comme précédemment, en choisissant comme points du contour ceux correspondant au minimum d'intensité sur une image dont on a soustrait le fond et donc pour laquelle le gain et le décalage (*offset*) ont été convenablement réglés (voir fig. II.11). La seconde étape est de prendre deux cercles concentriques de part et d'autres du contour détecté précédemment (voir fig. II.12 p. 71). Sur cette partie réduite de l'image on applique un seuillage dont la valeur est déterminée à partir de l'intensité moyenne des points entre les deux cercles et de l'intensité moyenne du contour précédemment détecté. Les points dont l'intensité est plus faible que le seuil sont conservés et considérés comme appartenant au contour. Enfin, pour déterminer la position le long d'un rayon repéré par son angle polaire (le centre étant celui de la vésicule), on fera une moyenne pondérée par le niveau de gris de chaque point restant après le seuillage. Cette méthode raffinée présente l'inconvénient d'une moyenne locale qui peut masquer des fluctuations de courte longueur d'onde ; la deuxième contrainte est l'hypothèse que la vésicule est proche de la forme sphérique.

Cette méthode a ensuite été appliquée à un certain nombre de systèmes [Fernandez-Puente et al., 1994; Méléard et al., 1997; Méléard et al., 1998; Gerbeaud, 1998] sans que les auteurs ne mentionnent d'amélioration ultérieure de la technique.

Analyse des contours Dès les premiers travaux de ce groupe [Faucon et al., 1989], une analyse en harmoniques sphériques a été introduite (pour une forme proche de la forme sphérique), et sera conservée dans les articles qui suivront. Par contre on ne projette pas le contour sur les séries de Fourier mais on calcule la fonction d'autocorrélation spatiale, puis temporelle du contour [Méléard et al., 1990] dans le plan diamétral de la vésicule. C'est ainsi qu'on relie les coefficients des harmoniques sphériques aux mesures effectuées. L'analyse est basée sur l'hamiltonien de courbure avec courbure spontanée. Il est à noter que ce groupe corrige les résultats expérimentaux du temps d'intégration de la caméra (sauf pour les expériences en lumière pulsée).

Limitations La principale limitation de cette méthode, comme celle du groupe de Sackmann est liée aux approximations faites dans la partie théorique et qui considère que la vésicule est proche de la forme sphérique. Cela exclut de l'étude tous les changements de phase des vésicules vers des formes non sphériques (voir § B.2.2 p. 18). De plus pour déduire le module de rigidité de courbure et la tension, on ne «fitte» pas la courbe et on ne mesure pas un spectre de fluctuations. Enfin, l'analyse n'est bien sûr applicable que si le modèle théorique est développé en harmoniques sphériques.

B.3.3 Méthode développée par Döbereiner et al.

Cette technique a été développée dans un objectif différent de la précédente au moins dans un premier temps [Döbereiner et al., 1997; Döbereiner, 2000a] ; en effet il s'agissait de rendre compte des changements de phase prévus par les modèles ADE

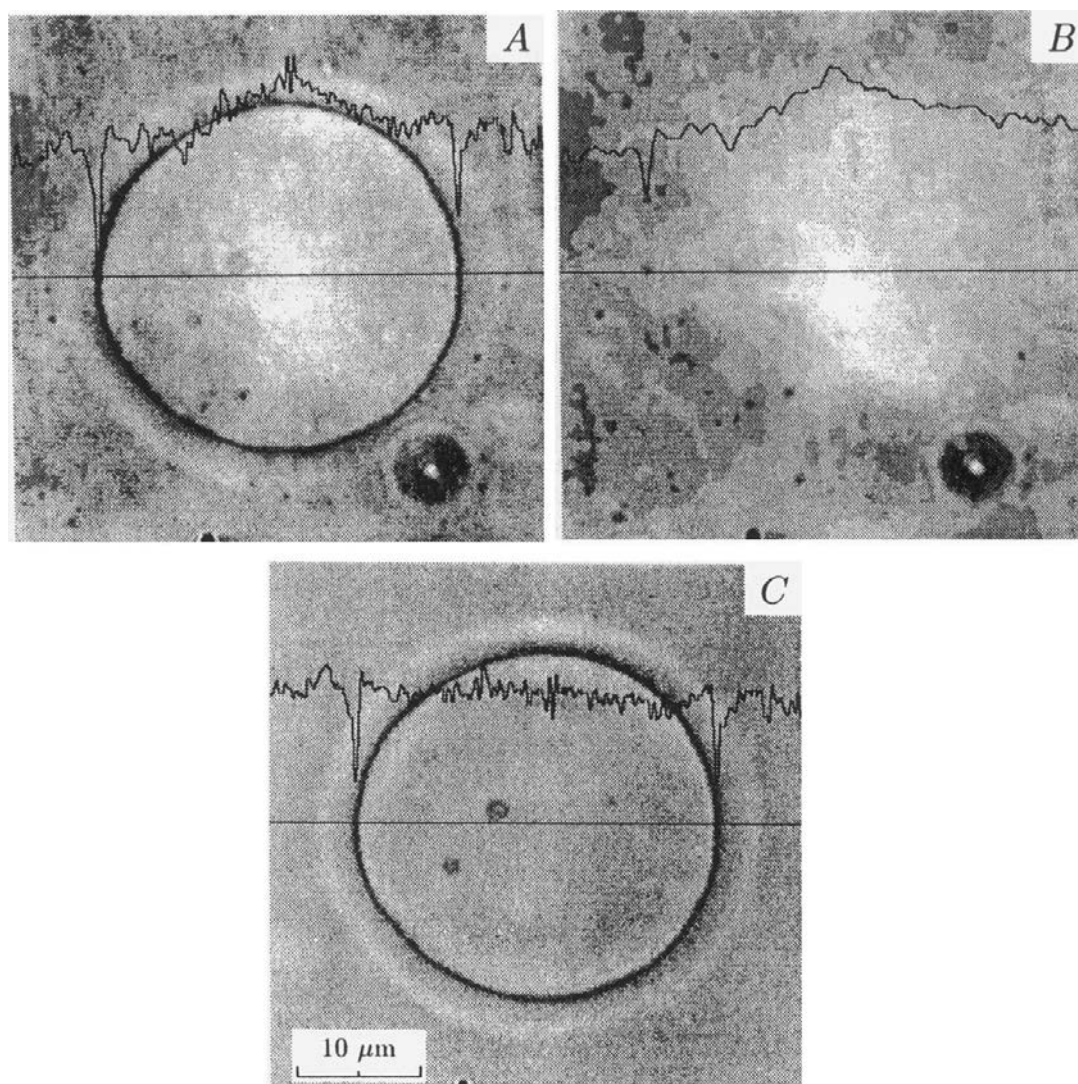


FIG. II.11 – Première étape de la reconnaissance de contour par la méthode de Mitov et al. A) représente l'image brute digitalisée d'une vésicule en contraste de phase, avec le profil le long de la ligne horizontale noire. B) représente le fond pris en se mettant hors focus par rapport à la vésicule, ainsi qu'un profil. C) représente l'image obtenue par soustraction de A-B, ainsi qu'un profil (d'après [Mitov et al., 1992]).

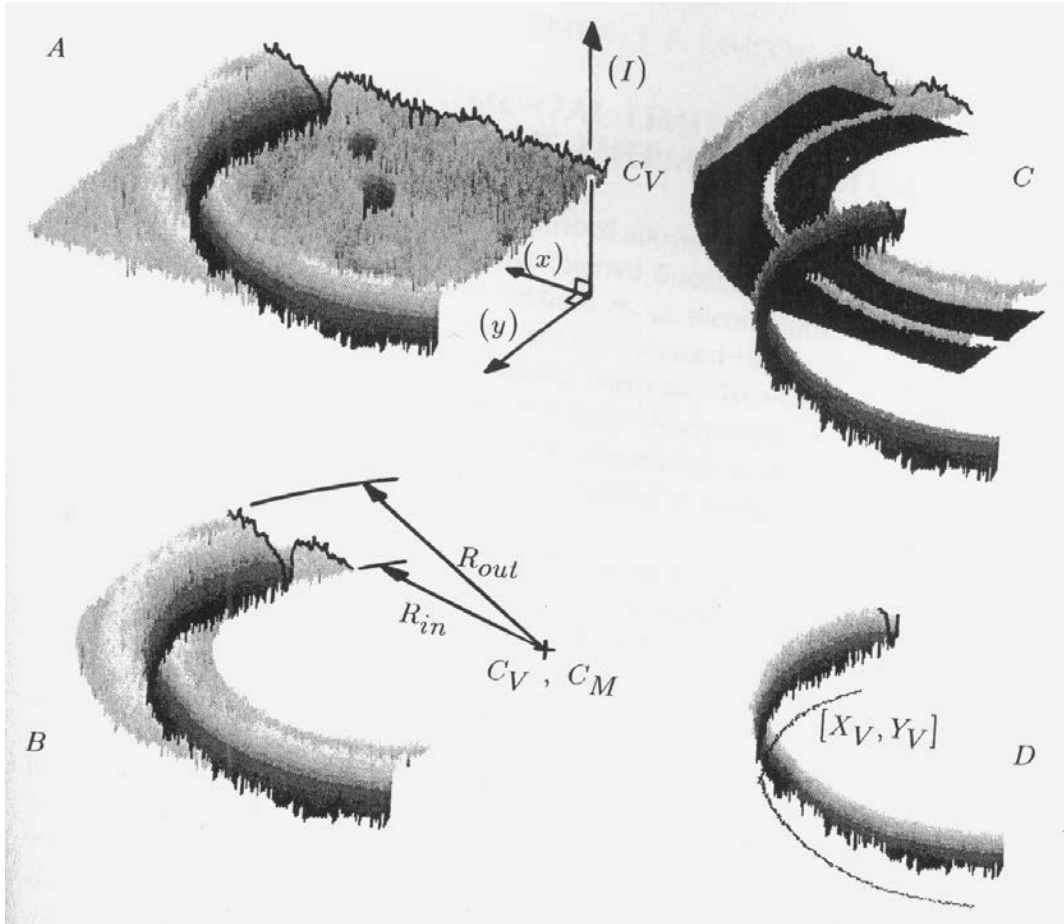


FIG. II.12 – Deuxième étape de la reconnaissance de contours par Mitov et al. On a représenté pour plus de clarté uniquement un quart de la vésicule. A) Niveaux de gris de l'image représenté par une nappe. B) Les parties entre deux cercles concentriques à la vésicule (de rayon R_{in} et R_{out}) sont effacés pour ne conserver que l'anneau contenant le contour. C) Un seuillage est effectué pour ne sélectionner que les points en dessous, qui sont pris comme appartenant au contour. D) Les points du contour (image C après seuillage). La position de la membrane le long d'un rayon est prise comme la moyenne pondérée par les intensités des points obtenus sur l'image D (d'après [Mitov et al., 1992]).

d’abord, puis ADE-SC ensuite (voir § § B.1.2 p. 11 ou le tableau I.2 p. 15) et non de mesurer les fluctuations. C’est pourquoi cette méthode va avoir deux caractéristiques principales :

- Cette détection va s’appliquer à des objets non sphériques ;
- La méthode a permis dans un premier temps d’accéder uniquement aux premiers modes du spectre de fluctuation, puisque ce sont ceux qui sont importants dans l’analyse des changements de forme des vésicules.

De plus il faut noter que c’est de cette méthode que nous sommes partis pour construire notre propre algorithme de détection de contours. C’est pourquoi on trouvera les détails de cette méthode dans ses développements récents au § B.2.1 p. 95.

Reconnaissance de contours La reconnaissance de contours est basée sur la forme en contraste de phase du profil perpendiculairement à la membrane. Ce profil comporte une partie que l’on remarque expérimentalement comme quasi-linéaire. On approche donc cette partie du profil par une droite ($\mathcal{D}$) et on va chercher le point sur le profil de niveaux de gris où cette droite coupe le niveau de gris moyen au voisinage de la vésicule. Cette technique a plusieurs avantages : elle évite de recourir au minimum d’intensité ce qui peut être source d’artefact si celui-ci n’est pas bien défini. Cette technique permet donc d’avoir une bonne résolution spatiale dans la direction où est prise le profil. Cette méthode a été appliquée à divers systèmes par la suite, mais est restée centrée sur l’étude des transitions de formes des vésicules dans le modèle ADE induites par différents procédés. [Döbereiner et al., 1997; Döbereiner et al., 1999; Döbereiner, 1999; Döbereiner, 2000b].

Analyse des contours Contrairement aux travaux cités précédemment, l’analyse est réalisée cette fois en décomposant la forme de la vésicule en modes de Fourier, et non en harmoniques sphériques. Elle suppose que la vésicule a une forme de révolution avec, comme génératrice, la courbe obtenue par coupe de la vésicule par un plan diamétral horizontal. Cela étend la technique aux objets de formes non sphériques mais restreint cependant aux objets de forme de révolution. Jusqu’à un développement récent [Döbereiner et al., 2003] cette technique n’avait pas permis de mesurer le module de rigidité de courbure. On peut noter le souci de prendre en compte l’effet de la gravité par une correction numérique, effet qui est négligé par d’autres auteurs. Néanmoins cet ajout se fait de manière numérique au moment de l’analyse des contours acquis. Elle ne permet pas, dans cette forme, de mesurer le spectre de fluctuations.

Limitations Le problème du temps d’intégration n’est pas pris en compte car cette méthode a été développée pour accéder aux premiers modes.

B.4 D'autres méthodes d'analyse des fluctuations

Enfin on peut citer l'expérience réalisée par Mutz et Helfrich [Mutz and Helfrich, 1990], où les mesures sont faites sur des portions de membranes en suspension et non sur des vésicules (voir fig. II.13). Cela contourne la difficulté liée à la modélisation théorique d'objets sphériques.

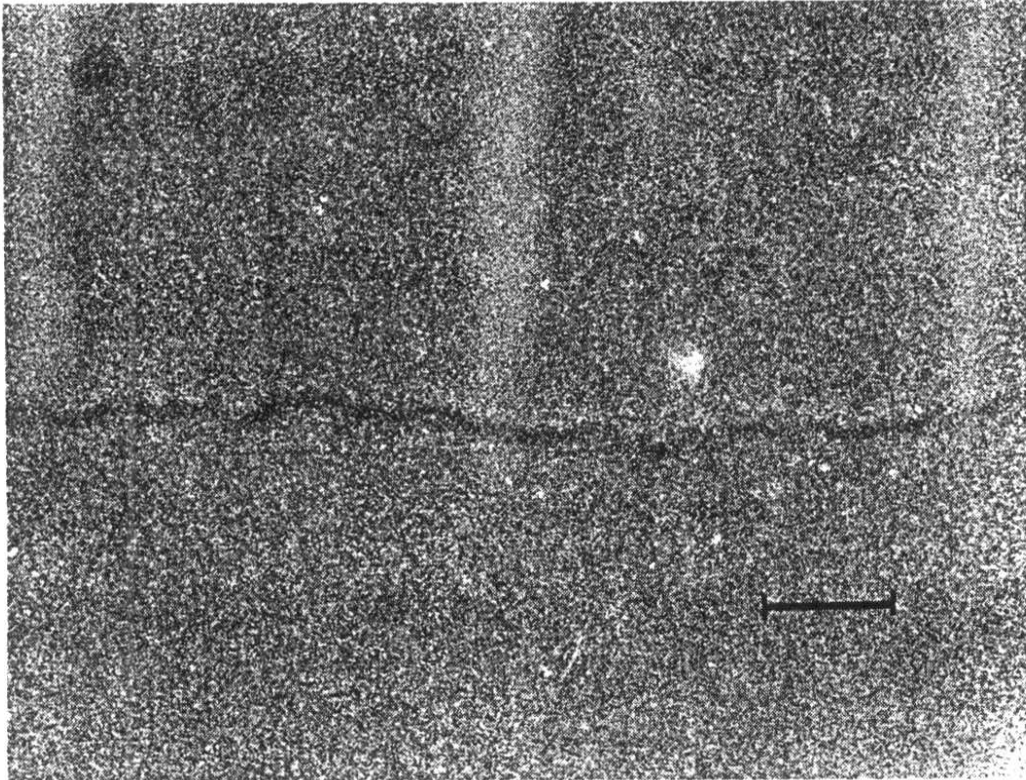


FIG. II.13 – Au centre horizontalement une portion de membrane fluctuante de DGDG (*Digalactosyl diglyceride*). La barre représente $10\,\mu\text{m}$ (d'après [Mutz and Helfrich, 1990]).

Les valeurs de contour obtenues sont corrigée de la courbure légère de la portion de membrane. Néanmoins ce système présente deux limitations :

- Il reste difficile à mettre en œuvre du point de vue de la fabrication des portions de membranes ;
- Les objets auxquels la membrane est rattaché peuvent avoir une influence sur ses fluctuations.

L'obtention d'un module de rigidité de courbure est correcte mais le spectre de fluctuation est sans doute modifié.

C. Méthodes actuelles de reconnaissance de contours

Les techniques de reconnaissance de contours se sont encore développées récemment pour différentes applications.

La puissance croissante des ordinateurs a permis de raffiner encore plus les méthodes d'analyse. C'est ainsi que Méléard et al. [Pott and Méléard, 2002] ont pu tirer pleinement profit de la fonction d'autocorrélation du rayon en temps et en espace pour montrer l'implication du coefficient de frottement des deux feuillets de la bicouche dans la dynamique des fluctuations.

Döbereiner et al. ont d'une part perfectionné leur algorithme de reconnaissance de contours en interaction avec notre groupe, mais ont par ailleurs profité des travaux de simulation numérique dans le modèle ADE-SC de Gompper et al. [Gompper and Kroll, 1998] (et voir § B.2.2 p. 22) pour permettre une analyse des formes des vésicules en les rapprochant de formes calculées par la méthode de Monte-Carlo (voir fig. II.14), et ainsi en déduire les paramètres physiques de la vésicule que sont la tension, le module de rigidité de courbure et la courbure spontanée simultanément [Döbereiner et al., 2003].

Henriksen et al ont pris en compte les effets de la gravité comme une perturbation aux formes initialement prévues [Henriksen and Ipsen, 2002] par l'analyse en harmonique sphérique (du même type que celle de Méléard et al.). Par ailleurs la reconnaissance est faite différemment de celle de Méléard et al. : la forme du minimum en intensité, probablement après un lissage (*smoothing*) est approchée par une gaussienne, en la positionnant pour s'adapter au mieux au profil. Le minimum de celle-ci est pris comme position de la membrane.

En l'état actuel du développement de ce type de technique, il n'était pas possible de mesurer directement le spectre de fluctuations de membranes hors-équilibre. D'une part la théorie n'a été développée que pour des membranes planes à ce jour et toutes les analyses n'étaient réalisables qu'en harmonique sphérique (ou pour les tout premiers modes de Fourier). A moins d'un développement théorique lourd, il fallait donc mettre en place une analyse qui permette d'utiliser des théories en membranes planes.

De plus, nous souhaitons pouvoir «fitter» l'ensemble des modes par l'expression du spectre de fluctuations. Enfin pour pouvoir distinguer le mieux possible les membranes passives et actives (on verra des simulations des résultats attendus au § A.1.1 p. 182), il était souhaitable de pousser les limites de la détection le plus loin possible, en augmentant la résolution spatiale, et ainsi le nombre de modes accessibles. Les techniques disponibles étaient en général limitées à environ 10 modes. Pour toutes ces raisons, nous avons été amenés à pousser les limites de la détection des protocoles de reconnaissance de H.-G. Döbereiner, puis à développer des outils d'analyse des spectres utilisables pour des membranes hors-équilibre. Les détails de notre technique sont donnés dans les deux chapitres suivants.

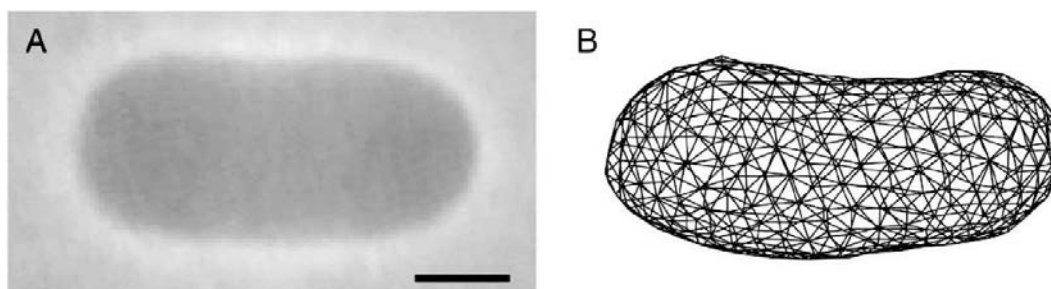


FIG. II.14 – A. Image d'une vésicule en contraste de phase (la barre correspond à $5\mu\text{m}$) et B. Sa forme approchée numériquement (d'après [Döbereiner et al., 2003]).

Chapitre II.2

De la vésicule fluctuante au fichier de contours



IL EXISTE CINQ ÉTAPES SUCCESSIVES IMPORTANTES pour l'analyse de contours des vésicules :

- la formation d'une image de la vésicule en contraste de phase avec un contraste et une résolution spatiale élevés ;
- l'acquisition par la caméra d'images avec un bon rapport signal sur bruit, un temps d'ouverture de l'obturateur contrôlé, à une fréquence d'acquisition raisonnable, puis le transfert à l'ordinateur ;
- l'analyse en temps réel par l'ordinateur des images reçues et l'extraction du contour de la vésicule avec une grande résolution ;
- ensuite l'analyse des contours pour obtenir les grandeurs physiques que l'on veut mesurer ; la comparaison des résultats obtenus aux expressions disponibles et prévues par la théorie.

Nous avons développé les outils pour optimiser ces différentes étapes et nous les détaillerons dans ce chapitre et le suivant.

Nous porterons notre étude au cours de ce chapitre sur les divers éléments de la chaîne de mesure allant du microscope, en passant par la caméra et la carte d'acquisition, jusqu'au programme d'analyse de contours. Nous détaillerons le rôle de chacun jusqu'à l'obtention d'un fichier informatique contenant pour chaque image, l'heure de sa capture et les coordonnées des points du contour.

A. Obtention d'une image de la vésicule dans la mémoire de l'ordinateur

A.1 Formation et caractéristiques d'une image de la vésicule en contraste de phase

A.1.1 Principaux éléments du dispositif expérimental

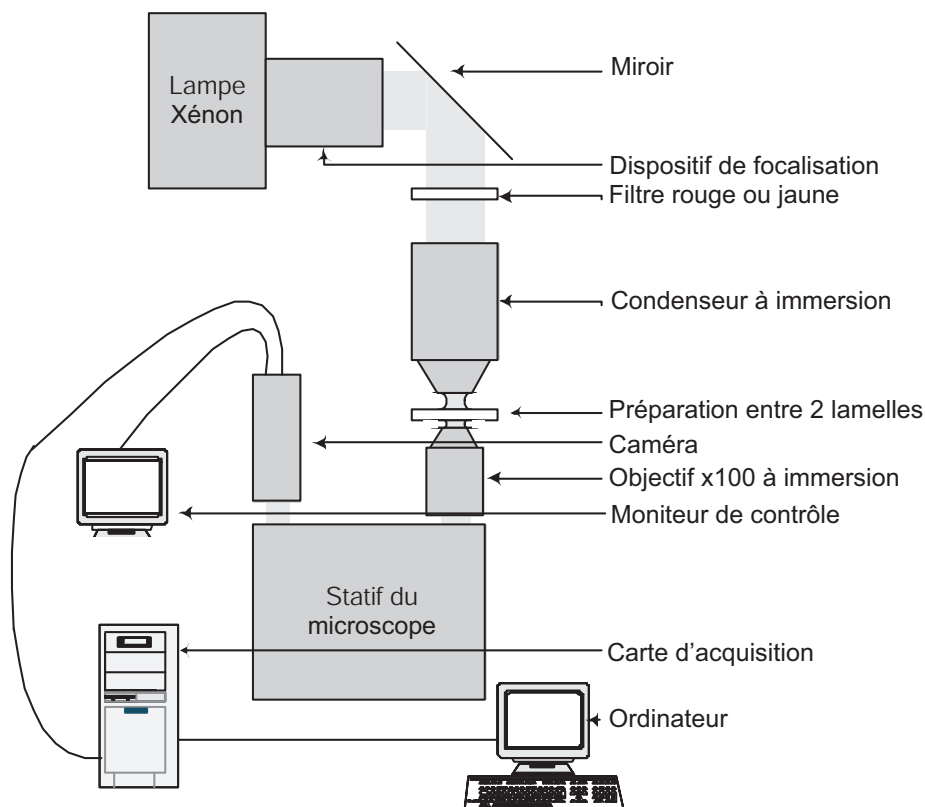


FIG. II.15 – *Schéma résumant les principaux éléments de l'expérience de reconnaissance de contours*

Au travers de l'optimisation optique du montage expérimental, nous avons deux buts (voir aussi à B.1.7 p. 120):

- Tout d'abord obtenir une image avec un contraste maximal afin d'obtenir un rapport signal sur bruit aussi grand que possible ;
- Par ailleurs obtenir une image aussi résolue que possible afin d'avoir une grande précision spatiale sur les contours obtenus.

Dans un premier temps, pour limiter le bruit, on peut diminuer le gain de la caméra en utilisant une puissance d'éclairage plus importante. Nous avons donc augmenté l'intensité d'éclairage, tout d'abord en utilisant une lampe halogène de 250 W branchée sur une alimentation extérieure, la lampe de 100 W, qui est montée

d'origine sur les microscopes ZEISS, AXIOVERT 135. Nous avons ainsi augmenté l'intensité. Toutefois, comme nous le verrons dans chapitre III.4 p. 181, nous souhaitons avoir aussi une intensité importante dans le rouge (entre 630 nm qui correspond à la coupure du filtre passe-bas utilisé et l'infra-rouge^a), afin de pouvoir comparer les séries de contours obtenues en éclairage jaune (où nous pourrions activer une protéine, la bactériorhodopsine) et en éclairage rouge (où la BR est passive); ce qui n'est pas possible avec des lampes halogènes. Il n'existe pas de lampe spectrale commerciale possédant des raies intenses entre 600 nm et 800 nm. Nous nous sommes donc orientés vers une lampe au xénon de 175 W (EUROSEP INSTRUMENTS) dont le spectre relativement plat permet après passage dans les filtres, une intensité en rouge raisonnable.

Pour avoir une résolution spatiale la meilleure possible, nous avons choisi de travailler avec un objectif $\times 100$, PLAN-APOCHROMAT afin d'avoir une qualité d'image optimale. Néanmoins ce type d'objectif nécessite pour obtenir des images fortement contrastées l'éclairage avec un condenseur de forte ouverture numérique (dans notre cas 1.4). C'est ainsi que nous travaillons donc avec un condenseur et un objectif à immersion à huile. Cela impose évidemment de travailler avec des préparations de faible épaisseur (au maximum 1 mm).

Enfin, le choix d'une caméra est important pour optimiser le rapport signal sur bruit et la résolution. Nous avons d'abord utilisé une caméra SONY HYPERHAD. Le bruit important^b, et le gain automatique, qui rajoute un artefact dans la reconnaissance, nous ont poussés à changer. Ensuite nous avons utilisé une caméra analogique LHÉSA LH510, qui permettait le réglage manuel de l'ensemble des paramètres et avait un niveau de bruit plus faible. Nous avons finalement opté pour une caméra digitale PULNIX TM1040 car elle avait non seulement les avantages d'une caméra digitale (voir A.2.2 p. 87) mais aussi un meilleur rapport signal/bruit.

A.1.2 Formation d'une image en contraste de phase

Comme nous le verrons dans la partie consacrée à l'algorithme de reconnaissance de contours, nous utilisons les spécificités de l'image en contraste de phase pour obtenir une position de la membrane avec une haute résolution. On ne va donner ici que les grandes lignes de cette technique d'imagerie en insistant sur les points utiles à la compréhension de notre méthode de reconnaissance de contours; on pourra se reporter à [Gu, 2000, p. 101], [Péré, 1994, pp. 50-54], [Inoué and Spring, 1997, pp. 71-74], [Born and Wolf, 1993, pp. 424-428].

Dans le cas de la formation d'une image d'amplitude^c à partir d'un objet d'amplitude^d, comme dans la microscopie en fond clair, l'onde incidente est partiellement diffractée par l'objet; cette partie de l'onde subit un déphasage de 180° . Sur le plan image elle provoque donc des interférences avec l'onde transmise directement sans

a. coupure des filtres anticaloriques placés en sortie de lampe.

b. diminuant comme nous le verrons B.1.7 p. 120 la partie de spectre utilisable.

c. image où l'information se trouve dans l'amplitude de l'onde lumineuse, ou dans l'intensité, et non dans la phase de cette onde.

d. objet interagissant sur la lumière en modifiant l'amplitude de l'onde lumineuse.

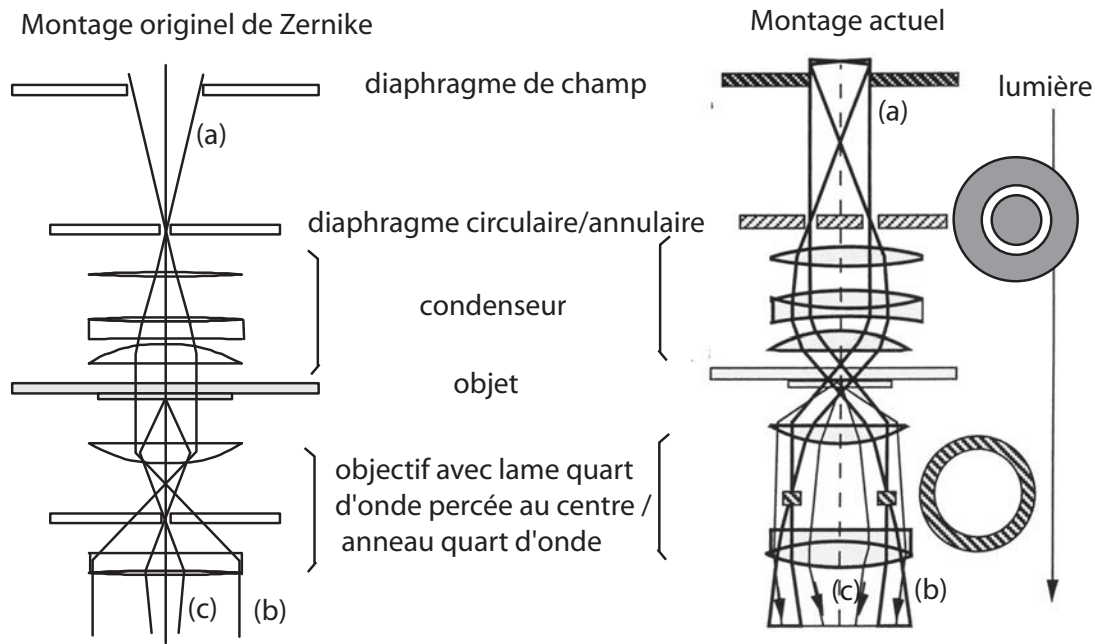


FIG. II.16 – Représentation schématique d'un microscope à contraste de phase, dans la configuration originelle de Zernike et dans la configuration utilisée lors de nos expériences. (a) indique le faisceau incident, (b) le faisceau non diffracté qui traverse la préparation, (c) le faisceau diffracté.

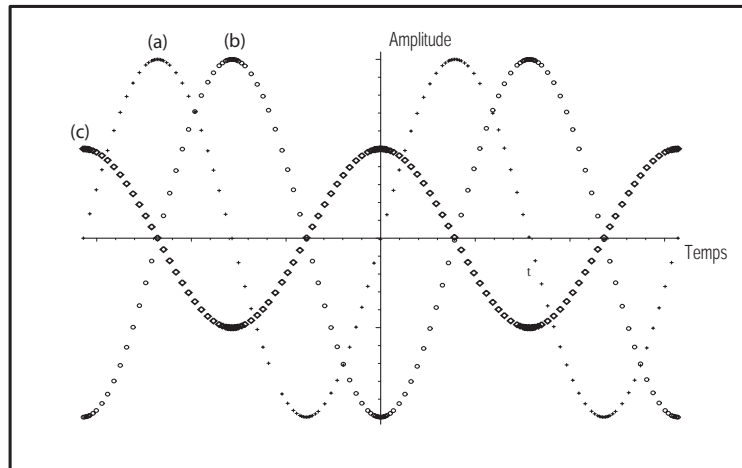


FIG. II.17 – Représentation des amplitudes en fonction du temps (pour la microscopie en contraste de phase) des faisceaux (a) incident, (b) non diffracté (mais ayant traversé la lame quart d'onde) et (c) diffracté (pour un pur objet de phase donc (c) déphasé par rapport à (a) de 90° plus le déphasage introduit par l'objet). On se reportera à la fig. II.16 pour plus de précision sur ces faisceaux. On notera que les interférences entre les faisceaux (a) et (c) donnent une image en amplitude du décalage de phase de (c) (qui est proche de 90°), donc de la phase de l'objet

interagir avec la préparation.

Nous souhaitons maintenant obtenir une image d'amplitude à partir d'un objet de phase (voir fig. II.16 et II.17) L'onde diffractée (c) n'est décalée que de $90^\circ + \delta \times (n_e - n_i)$ (où n_e est l'indice du milieu extérieur et n_i celui de l'objet et δ un coefficient) par rapport à l'onde incidente (a). On va donc à l'aide d'une lame quart d'onde rajouter un décalage de phase de 90° à l'onde incidente pour obtenir (b). On va ainsi créer des interférences proportionnelles uniquement à la différence de phase δ , soit une image d'amplitude à partir d'un objet de phase. Ceci correspond au montage originel de Zernike.

Une amélioration apportée rapidement est le remplacement du diaphragme circulaire^e et du disque retard quart d'onde, percé au milieu, par un diaphragme annulaire et un anneau retard quart d'onde. Cela permet d'offrir une zone de passage à l'onde non diffractée plus importante, car cette dernière peut néanmoins subir de petites perturbations dues à des impureté hors focus. Une seconde amélioration a été l'atténuation des rayons non diffractés pour les amener à une amplitude proche de celle des rayons diffractés. Dans le microscope à contraste de phase actuel, l'objectif contient un anneau de phase qui est en même temps un atténuateur.

Si on modélise un pur objet de phase par la fonction de transmission

$$F(x) = e^{i\phi(x)} \quad (\text{II.2.1})$$

et qu'on suppose que $\phi(x)$ est petit devant 1, alors on obtient dans le plan image une intensité [Born and Wolf, 1993, pages 425-426]

$$I(x') = 1 + 2\phi(x) \quad (\text{II.2.2})$$

Cette technique permet de réaliser des objets ayant une très faible différence d'indice avec le milieu ($\Delta n \geq 10^{-3}$). On peut noter dès maintenant que l'on observe que l'image formée d'un objet en contraste de phase d'un objet est entourée d'un halo qui, nous le verrons dans le paragraphe suivant, revêt dans notre cas une importance capitale [Wilson and Sheppard, 1981].

A.1.3 Modélisation de l'image d'une vésicule en contraste de phase

Nous allons modéliser le microscope à contraste de phase par le modèle «4f» (théorie de Abbe) basé sur le montage de Zernike (voir fig. II.16 et II.18). Nous voulons calculer le profil d'intensité d'une vésicule au voisinage de son bord. On va simplement modéliser la vésicule par deux plans semi-infinis d'indice optique différents. En effet cette différence entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules est dû à la différence d'indice entre les deux sucres utilisés en pratique, sucrose à l'intérieur et glucose à l'extérieur, voir B.2.2 p. 137). Si (x', y') est un système de coordonnées

e. Ce diaphragme est en fait le diaphragme d'ouverture dans l'éclairage de Koehler [Inoué and Spring, 1997].

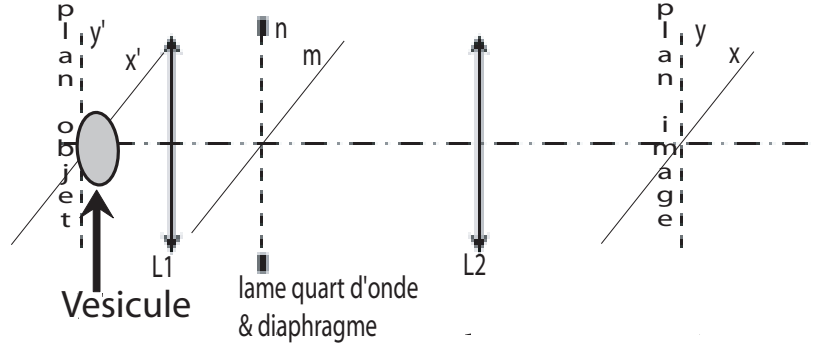


FIG. II.18 – Schéma du modèle «4f», dans la configuration originelle de Zernike. Le condenseur n'est pas représenté. L'objectif est modélisé par la lentille $L1$, et les oculaires par la lentille $L2$. On notera les systèmes de coordonnées utilisés, (x', y') dans le plan objet, (m, n) dans le plan intermédiaire conjugué des plan image et objet, et (x, y) dans le plan image.

dans le plan objet, on peut écrire la transmission de la vésicule

$$\begin{aligned} t(x', y') &= \exp(i\phi_i) & \text{si } x' > 0 \\ &= \exp(i\phi_e) & \text{si } x' < 0 \end{aligned} \quad (\text{II.2.3})$$

avec ϕ_i la phase des rayons diffractés par l'intérieur de la vésicule, et ϕ_e celle des rayons diffractés par le milieu extérieur à la vésicule. $\Delta\phi = \phi_i - \phi_e$ est la différence de phase entre les deux milieux.

L'objet est placé dans le plan focal objet de la lentille $L1$ et on regarde l'image dans le plan focal image de la seconde lentille. Dans le plan focal entre les deux lentilles (elles sont positionnées de sorte que le plan focal image de la première soit le plan focal objet de la seconde) se situe le disque transparent de diamètre b ; à l'intérieur, concentrique, se trouve la lame quart d'onde de diamètre a qui atténue aussi les rayons d'un coefficient d . Ce disque peut se modéliser par la fonction de transfert cohérente (CTF) (à une dimension) :

$$\begin{aligned} C(m, 0) &= di & \text{si } 0 < |m| < a \\ &= 1 & \text{si } a < |m| < b \\ &= 0 & \text{si } |m| > b \end{aligned} \quad (\text{II.2.4})$$

(m, n) correspond au système de coordonnées dans le plan focal image de la première lentille (plan conjugué de Fourier du plan objet, et qui est aussi le plan dans lequel se trouve le disque de phase). Pour plus de détail sur ce formalisme, on se reportera à [Gu, 2000, pages 97-102]. On obtient ainsi d'après [Wilson and Sheppard, 1981] l'intensité suivante dans le plan image ((x, y) est le système de coordonnées dans le plan image) :

$$I(x) = \left| d \cos\left(\frac{\Delta\phi}{2}\right) + \frac{2}{\pi} \sin\left(\frac{\Delta\phi}{2}\right) [(di - 1)\text{Si}(2\pi ax) - \text{Si}(2\pi bx)] \right|^2 \quad (\text{II.2.5})$$

où $\text{Si}(z) = \int_0^z \frac{\sin(t)}{t} dt$ est la fonction sinus intégral. Pour le détail des calculs, on pourra se reporter à [Gu, 2000, pages 97-102]. L'intensité $I(x)$ a été tracée à la fig. II.19 à différentes échelles spatiales.

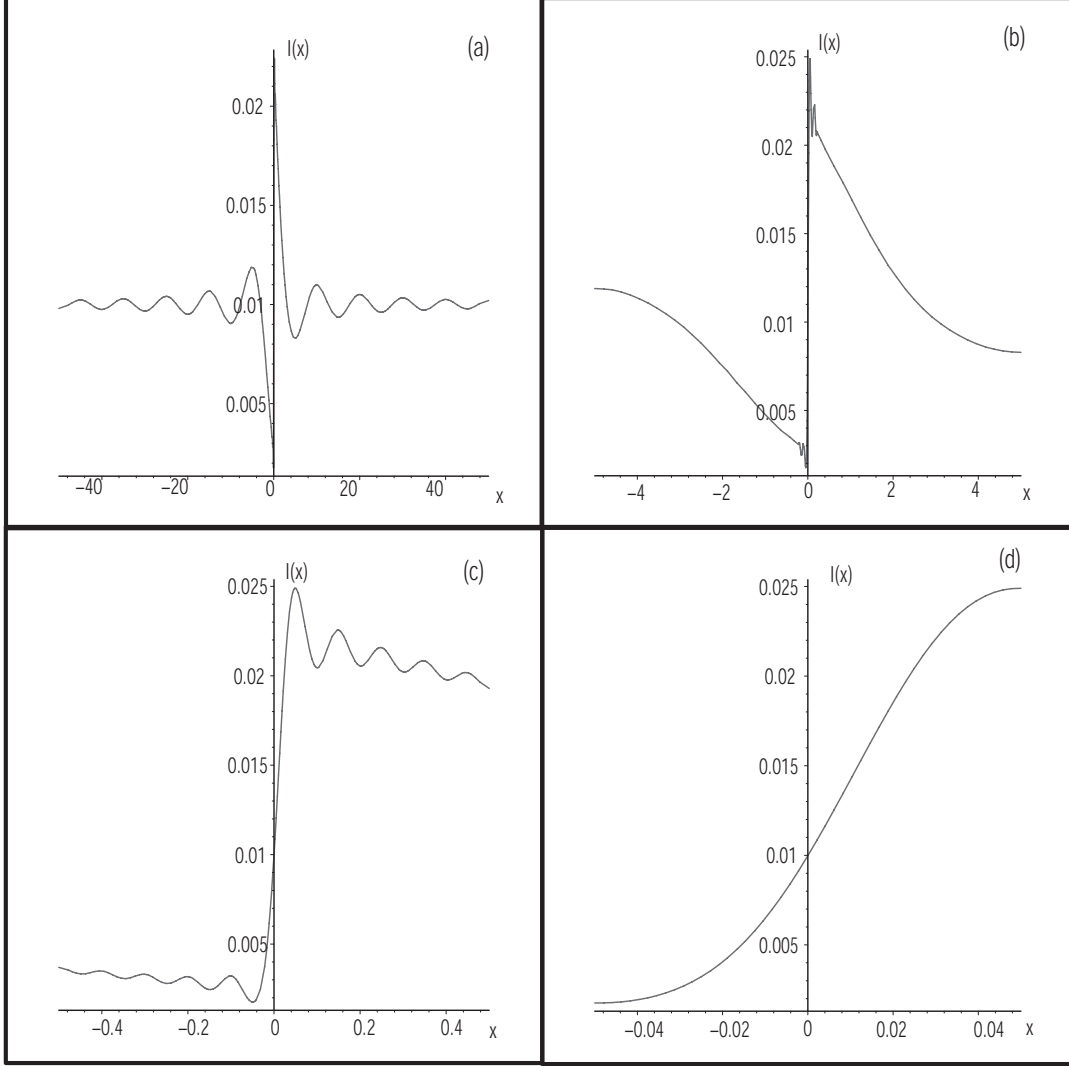


FIG. II.19 – Représentation graphique de l'intensité en fonction de la position dans le plan image, pour une vésicule modélisée par un saut de phase dans la direction x , d'après l'eq. II.2.5. On a pris ici $d = 0.1$, $\Delta\phi = 0.1$, $a = 0.1$, $b = 10$. Les différents graphes (a) à (d) représentent la même fonction avec un zoom sur la zone $x = 0$ de plus en plus important.

On retrouve aussi sur cette figure l'existence d'oscillations dans l'intensité au delà du bord réel de l'objet, ce qui correspond au halo observé expérimentalement (voir fig. II.24 p. 96 et II.25 p. 97). On peut noter que lorsqu'on est proche de 0, l'intensité obtenue (eq. II.2.5), peut être linéarisée, moyennant un développement

limité pour donner

$$I(x) \underset{x \rightarrow 0}{\simeq} d^2 \cos^2 \left(\frac{\Delta\phi}{2} \right) + 4 \frac{d \cos \left(\frac{\Delta\phi}{2} \right) \sin \left(\frac{\Delta\phi}{2} \right) (-2\pi a + 2\pi b)}{\pi} x \quad (\text{II.2.6})$$

Cette variation linéaire de l'intensité au voisinage du bord de la vésicule est effectivement observée expérimentalement. On verra dans le section B p. 92 que cette propriété du contraste de phase sera utilisée pour permettre la reconnaissance du contour (voir fig. II.24 p. 96).

A.2 Acquisition d'une image par la caméra

Une fois l'image de la vésicule en contraste de phase formée sur le capteur de la caméra, vient l'étape de son acquisition. Il faut noter qu'il est essentiel à cette étape que la caméra soit réglée manuellement, et ce, pour deux raisons principales:

- D'une part, les réglages automatiques de contraste, gain, niveau de noir, sont rarement optimaux par rapport à l'image en contraste de phase de la vésicule. En effet, la zone qui nous intéresse est le contour de la vésicule et représente donc en surface une faible proportion de l'image totale. Or les réglages automatiques sont basés sur une moyenne sur la totalité de l'image et sont probablement mal adaptés.
- D'autre part, les réglages ne doivent pas changer pendant l'acquisition pour ne pas introduire d'erreur sur la position de la membrane (voir § B.2.2 p. 99).

Un autre point important est la manière dont la caméra forme les images à partir des pixels du point de vue temporel. En effet, chaque pixel du capteur accumule les photons durant un temps dit «d'ouverture de l'obturateur»^f, le nombre de photons est transmis (à l'ordinateur par exemple), et le pixel est remis à zéro. Néanmoins, il est important de vérifier que tous les pixel sont remis à zéro en même temps, et acquièrent des photons sur le même laps de temps. Nous allons détailler ce point.

A.2.1 Caméra analogique

Dans ce type de caméra l'image est entrelacée ; elle est constituée de deux réseaux de lignes (par convention appelées paires et impaires) imbriqués appelés trames. Les caméras analogiques dont nous disposons sont à la norme CCIR. Ceci signifie que les lignes étant numérotées de 0 à M , les lignes portant un numéro pair^g sont d'abord transmises à la caméra, dans leur ordre de numérotation. Dans un deuxième temps, les lignes portant un numéro impair sont envoyées, dans l'ordre de leur numérotation. Comme nous allons le voir dans ce qui suit, la séquence de transmission de l'image ne préjuge pas de la manière dont l'acquisition de l'image est faite par la caméra.

f. Cette terminologie peut prêter à confusion, sachant que dans notre cas, il n'y a aucun obturateur mécanique.

g. Il est purement conventionnel de commencer par les lignes paires.

Néanmoins, l'acquisition la plus simple et la plus courante est celle faite de la même manière que la transmission, le pixel étant réinitialisé juste après transmission de sa valeur. Il existe deux modes de fonctionnement de la caméra : le mode trame et le mode image (pour ce dernier, il existe deux variantes).

Mode image standard C'est le mode de fonctionnement des caméras les moins chères, telles la SONY HYPERHAD que nous avons utilisée au début. Si les colonnes sont indexées par i entre 0 et N , et les lignes par j entre 0 et M , pour les pixels tels que j est pair, les photons sont accumulés sur ce pixel à partir de l'instant $t = i \frac{20}{(M+1)} \frac{40}{(M+1)(N+1)}$ pendant 40 ms ; quant aux pixels tels que j est impair, les photons sont accumulés à partir de l'instant $t = 20 + (i - 1) \frac{20}{(M+1)} \frac{40}{(M+1)(N+1)}$ et pendant 40 ms. La valeur de chaque pixel est lue et transmise par la caméra une fois les 40 ms de temps d'exposition écoulées. Pour la trame paire suivante les pixels sont pris à partir de $t = 40 + i \frac{20}{(M+1)} \frac{40}{(M+1)(N+1)}$. Et ainsi de suite (voir fig. II.20).

Ce mode pose le problème évident qu'aucun des pixels ne recueille la lumière sur le même laps de temps ; dans ces conditions, l'étude de la dynamique devient complètement impossible. C'est pourquoi nous avons très rapidement abandonné ce type de caméra.

Mode image avec mémoire de transfert En standard la caméra LHÉSA LH510 fonctionne en mode image. C'est-à-dire que si on représente la matrice CCD par les indices (i, j) indexant la position en abscisse et en ordonnée, alors pour les pixels des lignes paires (j pair), l'accumulation de photons sur le capteur CCD se fait entre $t = 0$ ms et $t' = 40$ ms. Ensuite pour les pixels dont l'indice j est impair (trame impaire), l'accumulation des photons sur le capteur CCD se fait en même temps pour tous les pixels de cette trame, entre $t = 20$ ms et $t' = 60$ ms. Les pixels de la trame paire suivante sont pris entre $t = 40$ ms et $t' = 80$ ms (voir fig. II.20).

Ce mode paraît déjà plus satisfaisant, car tous les pixels d'une même trame intègrent le flux lumineux sur le même laps de temps. Néanmoins, l'image complète est constituée de la superposition de ces deux trames qui n'ont pas été acquises sur le même laps de temps. On verra dans le paragraphe A.3.1 p. 89 que l'on peut contourner cette difficulté et traiter les trames paires et impaires comme deux images différentes ; néanmoins, même dans le cas d'un tel traitement, deux problèmes demeurent :

- les trames paires et impaires ne représentent pas exactement les mêmes points sur la vésicule et sont évidemment décalées, ce qui peut introduire un artefact si on suppose que chaque trame représente les mêmes points à des dates différentes ;
- les deux trames ne représentent pas des images successives de la vésicule, mais des images prises avec un décalage de 20 ms alors que l'accumulation de photons se fait durant 40 ms pour chaque trame. Ce recouvrement des périodes sur lesquelles les trames paire et impaire sont acquises, rendrait le traitement des résultats difficile et notamment la prise en compte de l'intégration en temps (voir paragraphe B.1.6 p. 119).

A. Obtention d'une image de la vésicule dans la mémoire de l'ordinateur

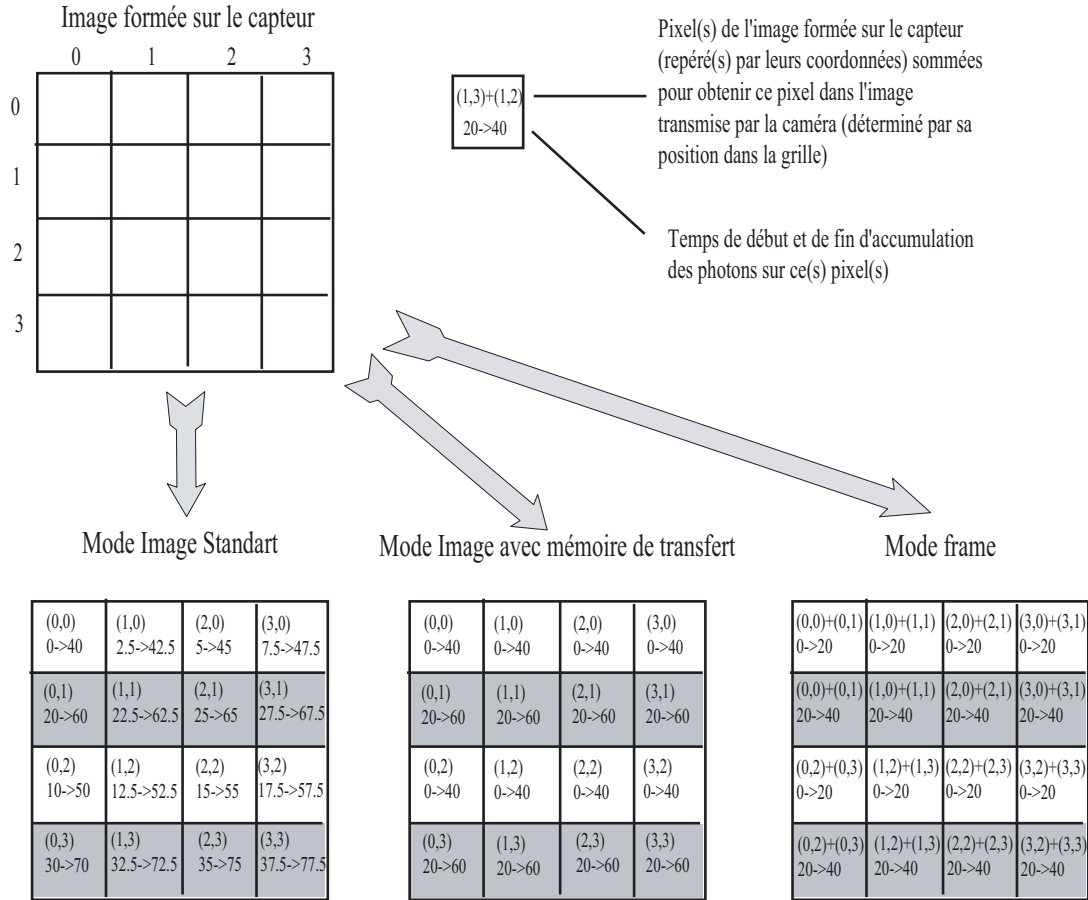


FIG. II.20 – Formation des images obtenues selon les différents modes, avec une caméra analogique dont la taille du capteur a été fixée ici à 4×4 . Les trois grilles du bas représentent ce qui est transmis par la caméra.

Mode *frame* C'est dans ce mode que nous avons effectué l'ensemble de mesures, lorsque nous avons utilisé la caméra analogique LH510. Dans ce mode, pour la trame paire comme pour la trame impaire, l'accumulation de photons se fait entre $t = 0$ ms et $t' = 20$ ms. A ce moment, les valeurs stockées dans les pixels $(i, 2k)$ et $(i, 2k + 1)$ sont sommées, k variant entre 0 et $(N - 1)/2$ (où N est le nombre de lignes), afin d'obtenir la même sensibilité que lors de l'acquisition durant 40 ms sur un simple pixel. Cette somme des deux trames est transmise comme trame paire par la caméra. Ensuite, l'ensemble des pixels sont remis à 0 et on refait une acquisition de 20 ms suivant le même processus. Le résultat est envoyé comme trame impaire, etc. . . (voir fig. II.20)

On note là que moyennant le traitement séparé des deux trames envoyés par la caméra (paire et impaire) il est possible d'obtenir deux images sans recouvrement temporel avec l'ensemble des pixels de chaque image acquis en même temps, pendant la même durée. De plus sur chaque trame, les mêmes pixels sont représentés. Néanmoins, la résolution verticale est réduite d'un facteur deux.

A.2.2 Caméra digitale, amélioration apportées à l'acquisition

Nous avons finalement opté pour une caméra digitale. Dans ce cas, l'image n'est pas entrelacée donc l'image qui est transmise à l'ordinateur ne nécessite aucun traitement particulier, puisque pour tous les pixels, les photons ont été accumulés sur la même période de temps.

Outre cet avantage notable, une caméra numérique a généralement un meilleur rapport signal sur bruit ; en effet, dans le cas d'une caméra analogique, le niveau de gris des pixels est envoyé sous forme d'une tension plus ou moins élevée^h ; cette information transite via un câble blindé depuis la caméra jusqu'à la carte d'acquisition ; à cette étape du bruit se rajoute au signal. Au contraire, dans le cas d'une caméra digitale, la conversion-analogique digital se fait dans la caméra à la sortie du capteur, et les informations sont transmises numériquement de la caméra jusqu'à la carte d'acquisition, assurant un rapport signal sur bruit meilleur.

Enfin, suite à la transmission analogique du signal d'une caméra analogique à la carte d'acquisition, il y a une imprécision sur le calcul des niveaux de gris à chaque pixel (voir pour les détails § A.3.1 p. 89). Cette imprécision n'a évidemment pas lieu dans le cas d'une transmission numérique des données de l'image.

Enfin, dans notre cas particulier, nous avons gagné en résolution (passant de 755×484 pixels pour la LH510 à 984×1010 pour la caméra digitale) et en dynamique puisque la carte d'acquisition nous permettait une numérisation sur 8 bits dans le cas de caméra analogique, tandis que la caméra digitale fonctionne sur une dynamique de 10 bits. Il faut noter enfin que la fréquence d'acquisition de la caméra digitale (30 images par seconde) est similaire à celle des caméras analogiques (25 images par seconde).

h. En effet c'est une tension qui est produite sur le capteur CCD correspondant au nombre de photons reçus par le pixel.

A.3 Carte d'acquisition d'image

Nous avons travaillé avec trois cartes d'acquisition différentes. Dans un premier temps, avec les caméras analogiques, nous avons utilisé une MATROX, METEOR STANDART, pour ensuite aller vers une MATROX, METEOR II STANDART qui avait sensiblement les mêmes caractéristiques. Le fait de garder la même marque a permis une transposition rapide du programme d'acquisition que nous avons écrit à partir des routines en C fournies dans le MIL-LITEⁱ pour commander et utiliser la carte depuis un programme écrit en C/C++. Enfin lors du passage à la caméra digitale nous avons utilisé une MATROX METEOR II DIGITAL 4/L.

Le but est d'acquérir des images de vésicules en temps réel, donc à la fréquence vidéo (25 images par seconde dans le cas des cartes analogiques, 30 images par seconde dans le cas de la carte digitale), et reconnaître et stocker le contour en temps réel et non de stocker les images dans leur totalité^j.

La reconnaissance des contours doit être réalisée à une vitesse équivalente à celle de l'acquisition. Nous allons donner ici les principes généraux qui nous ont permis d'optimiser le traitement pour obtenir cette vitesse :

1. Nous avons désactivé le traitement standard des erreurs afin d'écrire un traitement spécifique ; en effet lors d'une erreur d'acquisition sur une image (souvent due à une mauvaise réception des *pulses* de synchronisation), nous souhaitons que cette image soit simplement écartée pour passer sans interruption à l'image suivante.
2. Par ailleurs la carte est paramétrée pour utiliser les ressources mémoires et processeur de l'ordinateur dans le cas où celle de la carte ne suffisent pas. Nous avons travaillé dans un premier temps avec un ordinateur équipé d'un Pentium III 600 MHz avec 256 Mo de mémoire vive (afin de réserver une zone de mémoire suffisante spécialement à la carte, pour y mettre la file d'attente des images à traiter (voir § B.2.2 p. 99)). Puis nous avons finalement opté pour un double Xéon à 1,5 GHz avec 512 Mo de mémoire vive. Le choix d'un double processeur permet que l'un compense les manques de puissance de la carte d'acquisition pour créer la file des images à traiter, pendant que l'autre effectue la reconnaissance de contours.
3. Enfin, nous avons utilisé toutes les optimisations possibles pour utiliser aux mieux les fonctions du processeur et des cartes graphique et d'acquisition : DIRECTDRAW^k, MMX, SSE, SSE2^l.

i. Ensemble de bibliothèques permettant le pilotage en C/C++ des cartes d'acquisition MATROX.

j. Le problème est lié à la place disponible sur les disques durs actuels ; en effet pour stocker 2000 images (série standard pour nos expériences), il faudrait environ 1 Go dans le cas des cartes analogiques et 4 Go dans le cas de la carte digitale. On serait aussi limité par le débit d'écriture sur le disque dur (à tenir pendant plusieurs minutes) : 12,5 Mo/s dans le cas des cartes analogiques et 60 Mo/s dans le cas de la carte digitale.

k. Bibliothèque de procédure de traitement d'image qui utilise le processeur graphique pour ces opérations à la place du processeur central, le rendant disponible pour d'autres tâches.

l. Sets d'instructions supplémentaires des processeurs INTEL, qui offrent des commandes directes pour des applications multimédia.

A.3.1 Cartes à entrée analogique (caméra analogique)

Dans un premier temps, nous verrons les généralités sur l'acquisition depuis une caméra analogique pour ensuite détailler un peu plus certains aspects spécifiques à notre expérience.

Codage analogique Dans un premier temps, il faut remarquer (voir fig. II.21) que le niveau de gris en sortie de caméra est codé par une tension, ainsi le moindre bruit venant perturber cette tension (notamment dû au câble connectant la caméra à la carte) introduit des erreurs dans le codage de l'image.

Le «jitter» Derrière ce vocable anglo-saxon se cache un problème de synchronisation. En effet, comme on le remarque fig. II.21 les *pulses* d'horloge qui permettent dans le signal continu d'une ligne de séparer des pixels, sont générés par la carte d'acquisition et synchronisés périodiquement avec le *pulse* de synchronisation de trame du signal analogique. Ce procédé de synchronisation périodique d'une horloge de carte indépendante introduit une imprécision notable sur la position horizontale d'un pixel ; on pourrait dire que la carte place la séparation entre les pixels plus ou moins au bon endroit avec une précision assez faible. Ce manque de précision est un défaut assez général des systèmes analogiques [Inoué and Spring, 1997].

Image entrelacée Comme nous l'avons déjà mentionné au § A.2.1 p. 84, l'image produite par une caméra analogique se présente sous la forme de deux trames qui correspondent finalement à des pixels et des instants différents en fonction des modes de fonctionnement des caméras. Dans le cas du mode trame, dans lequel nous avons travaillé, nous avons traité séparément chaque trame comme une image à elle seule (avec la précaution que la résolution en ordonnée est deux fois moindre qu'en abscisse), et appliquant les algorithmes de reconnaissance de contour sur chacune d'elles séparément.

A.3.2 Carte digitale (caméra digitale)

La première remarque à faire est que les chronogrammes donnés à la fig. II.22 p. 91 sont spécifiques à notre modèle de caméra ; en effet, les signaux de sortie des caméras digitales ne sont pas standardisés.

Codage digital L'avantage le plus évident d'une caméra est le codage de l'information sous forme digitale, c'est-à-dire qu'une petite perturbation des tensions des signaux de données n'altère en rien l'information transmise, puisque la conversion analogique digitale est faite dans la caméra elle-même, juste à la sortie du CCD.

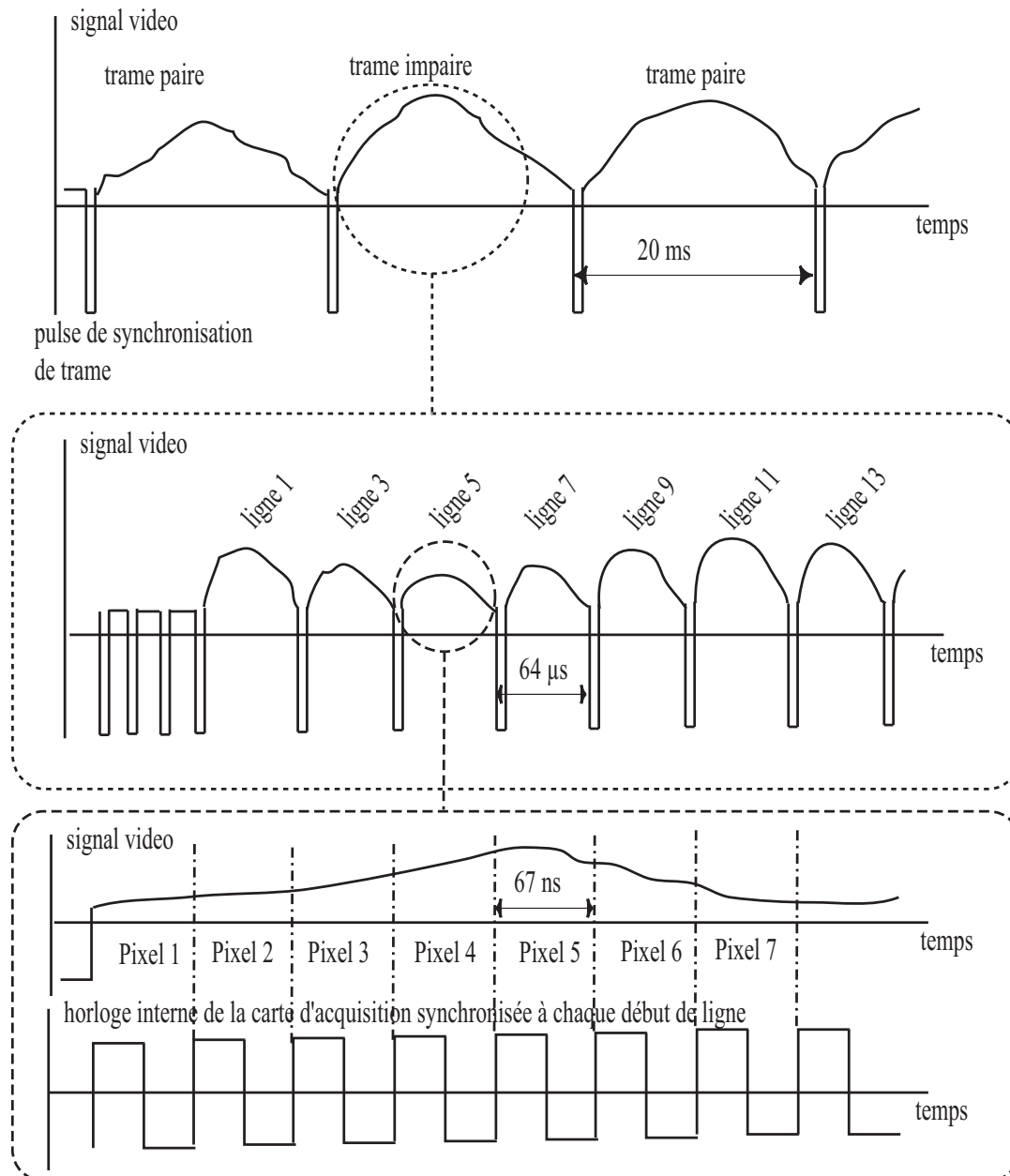


FIG. II.21 – Chronogramme à différentes échelles des signaux émis par la caméra au standard CCIR (d'après [Inoué and Spring, 1997, pages 197 à 203])

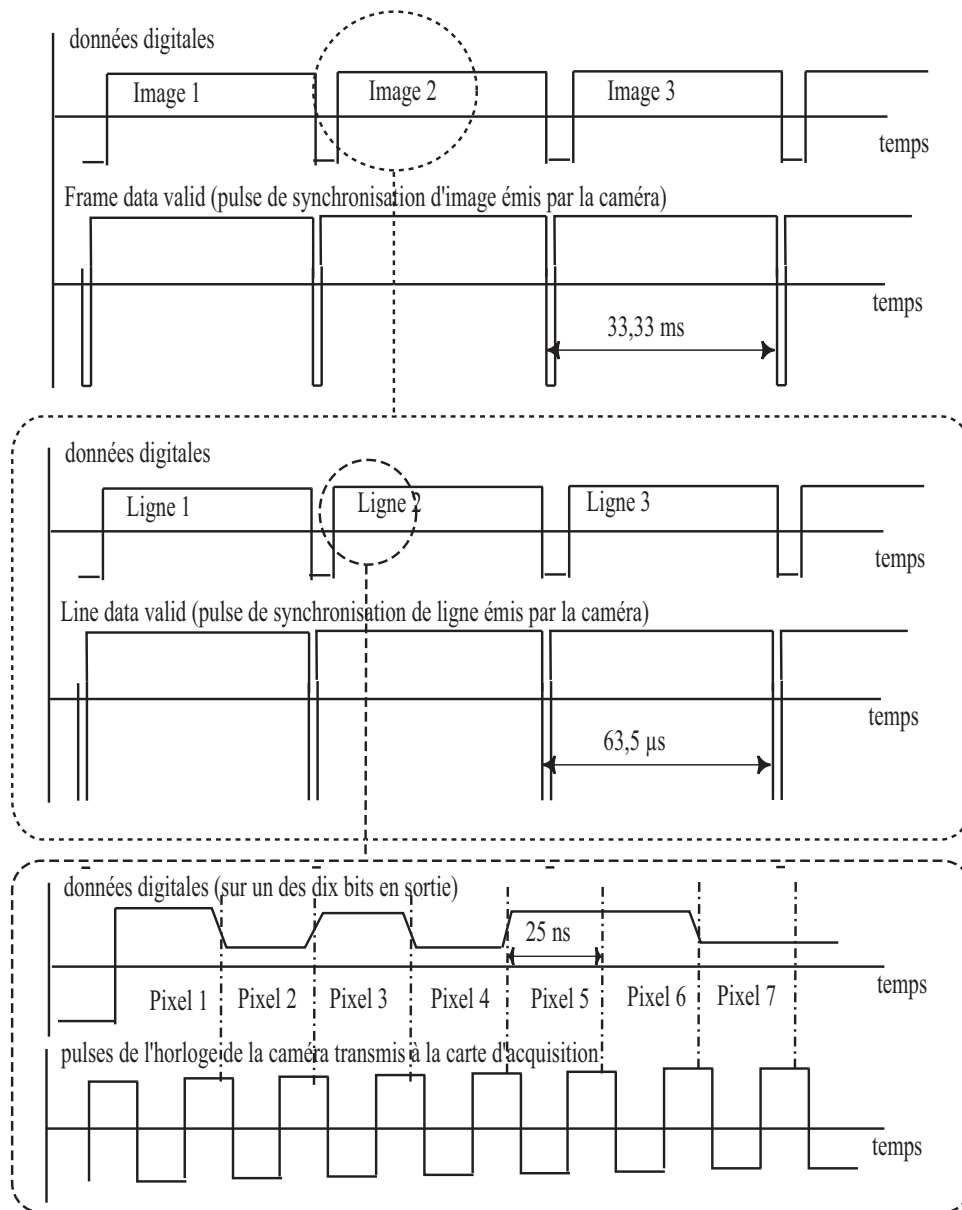


FIG. II.22 – Chronogramme des différents signaux émis par la caméra dans le cas de la caméra digitale PULNIX, TM1040. Le signal «Frame data valid» indique la fin de la transmission d'une image, le signal «Line data valid», la fin de la transmission d'une ligne de l'image. Par ailleurs la valeur de chaque pixel est lue, convertie en un entier entre 0 et 1023, et sur les dix broches de sortie est envoyé un nombre binaire représentant cette valeur (une tension haute ou basse sur chacune des dix broches, correspondant à un 1 ou un 0) pendant la durée d'un cycle d'horloge, puis on passe au pixel suivant (d'après le manuel d'utilisation).

Précision spatiale Un autre avantage notable est l'émission par la caméra de signaux de synchronisation d'image, de ligne et de pixel. Ainsi il n'y a pas d'imprécision sur la position du pixel auquel est «attribué» un niveau de gris, et tout problème de type «jitter» est évité.

Dynamique plus large Les cartes analogiques mentionnées ci-dessus numérisaient le signal vidéo sur 8 bits ; les niveaux de gris vont de 0 à 255. Dans le cas de notre caméra digitale, la dynamique est de 10 bits, soit des niveaux de gris compris entre 0 et 1023.

B. Reconnaissance du contour

Une fois l'image dans la mémoire de l'ordinateur, il faut extraire le contour de la vésicule.

B.1 Acquisition des images et stockage provisoire

La première étape va être de mettre en mémoire un *buffer*^m contenant toutes les informations de l'image arrivée sur la carte d'acquisition.

B.1.1 Le principe

La carte d'acquisition reçoit en permanence des images depuis la caméra à une fréquence de 25 images par seconde (caméra analogique) ou 30 images par seconde (caméra digitale) ; on va envoyer des instructions à la carte de sorte que la prochaine image reçue soit mise dans la mémoire de l'ordinateur sous forme de «buffer».

B.1.2 Implémentation et optimisation

Nous allons voir ici le fonctionnement global du programme de reconnaissance de contours représenté sur la fig. II.23. Le détail de l'algorithme de reconnaissance de contour sera donné plus loin au § B.2.2 p. 99. Nous emploierons le terme de processus pour désigner les morceaux de programme exécutés de manière simultanée (cela correspond à la dénomination anglaise *thread*). Afin de permettre autant que possible une acquisition en temps réel, nous donnons à ces processus un niveau de priorité élevé, par rapport à l'ensemble des processus en cours d'exécution sur l'ordinateur. Nous parlerons d'image et de contour, mais cela correspond à chaque fois à des types

m. On prendra ici la terminologie anglosaxonne. Il s'agit d'une succession de cases mémoire contiguës contenant chacune le niveau de gris d'un pixel. Ainsi tous les pixel d'une ligne se trouvent rangés dans l'ordre, et les lignes se suivent dans l'ordre de leur numérotation.

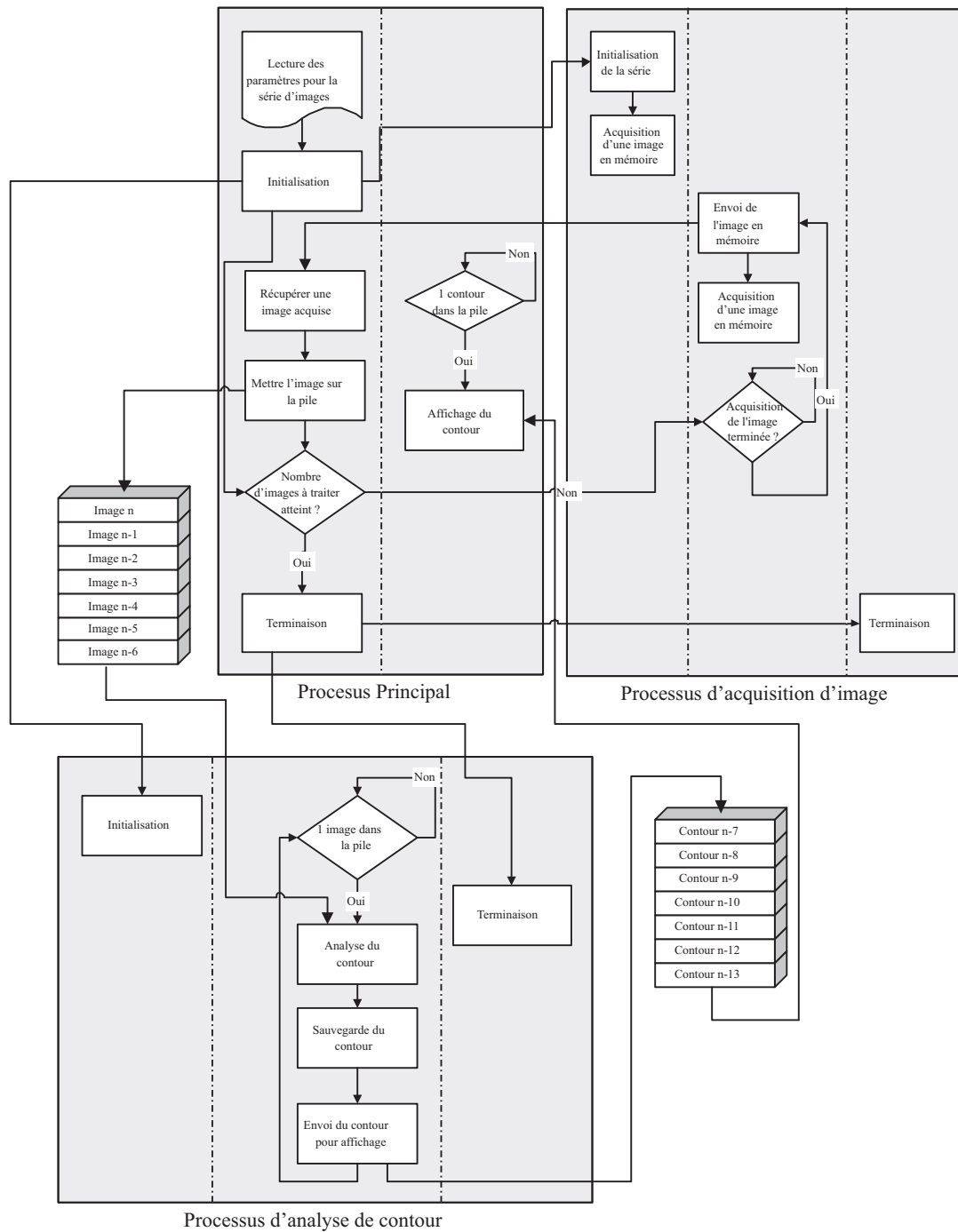


FIG. II.23 – Schéma de l'implémentation de l'algorithme de reconnaissance de contour. Chaque colonne représente un processus (thread) tandis que les cadres grisés représentent les trois processus (process qui comportent chacun plusieurs threads). L'explication de l'algorithme à partir du schéma est l'objet du § B.1.2.

de donnée spécifiques contenant non seulement l'image ou le contour, mais aussi les paramètres de taille, divers paramètres techniques et l'instant de l'acquisition.

Le processus principal Lorsque l'utilisateur débute la reconnaissance de contour, il doit spécifier un certain nombre de paramètres : la région de reconnaissance, un point proche du centre de la vésicule, le nombre d'images à traiter, les paramètres de l'algorithme (voir § B.2.2 p. 99), le nom du fichier de sauvegarde. Une étape d'initialisation est faite et est provoquée dans chacun des deux autres processus. Ensuite une boucle va répéter le nombre de fois prescrit, une requête d'image faite au processus d'acquisition d'image. Lorsque ce processus a acquis une image, il la transmet au processus principal qui attend cette image. Ce dernier met l'image sur une pile et refait une requête d'image (si le nombre d'images à traiter n'est pas atteint). Dans le cas où le nombre d'images à traiter est atteint, les instructions pour terminer la série sont exécutées, et provoquées dans chacun des deux autres processus.

Nous avons utilisé une spécificité de WINDOWS afin de créer une pile d'images à traiter. En effet, chaque processus a une file d'attente de messages (entrée au clavier, mouvement de souris, activation de fenêtre, etc...) à traiter. Le programme définit la procédure à exécuter en fonction du message. Nous avons défini un message spécifique «image», et nous envoyons ainsi les images au processus d'analyse de contour. Celui-ci constitue une pile d'images à traiter dont la taille (128 Mo pris dans la mémoire vive) peut absorber un léger retard de l'analyse à un moment donné (par exemple sur un contour en particulier, plus difficile à reconnaître) ; retard qui est rattrapé par la suite sur des contours plus faciles à traiter.

Par ailleurs, le processus d'analyse de contour envoie un message «contour» périodiquement (au choix de l'utilisateur pour chaque image analysée ou toutes les n images) dans la file des messages. Ainsi en parallèle de l'acquisition, ce processus, lorsqu'un message «contour» est reçu, affiche le contour calculé sur l'image acquise afin de permettre la vérification de la qualité de la reconnaissance.

Le processus d'acquisition d'image Ce processus, une fois initialisé, va acquérir les images en devançant la requête du processus principal. Ainsi lorsqu'il reçoit une requête, il vérifie qu'il a fini d'acquérir l'image qu'il était en train d'acquérir, sinon il attend d'avoir fini, puis envoie cette image et recommence l'acquisition d'une image en prévision d'une nouvelle requête.

Le processus d'analyse de contours Ce processus doit d'abord être initialisé lors de l'initialisation générale, afin de recevoir les différents paramètres (voir § B.2.2 p. 99). Ensuite dès qu'une image se trouve dans la pile (donc dès que le processus reçoit un message «image»), il entame l'analyse du contour de la manière indiquée dans le § B.2.2 p. 99. Le contour est ensuite sauvegardé (on a, en fait, la possibilité de sauvegarder un contour tous les n contours), et ensuite un message «contour» est envoyé au processus principal, et se rajoute donc sur la pile. Une procédure de fin est exécutée après la série de contours sur requête du processus principal.

Synchronisation des processus Le point important à noter est la construction de ce programme en trois processus, ce qui permet de tirer pleinement partie des deux processeurs de l'ordinateurs (ainsi que de la capacité multitâche des processeursⁿ). En effet, le traitement en temps réel nécessite que l'acquisition se fasse en permanence (puisque'il n'y a pas de pause entre les images), et par ailleurs, il est nécessaire de trouver le contour au fur et à mesure de l'acquisition des images pour limiter le nombre d'images stockées dans la pile.

L'utilisation des piles -en fait la file d'attente des messages du processus- permet de donner un maximum de souplesse et d'indépendance à ces processus. Ainsi nous pouvons laisser fonctionner de manière autonome les processus; c'est la solution que nous avons adoptée préférentiellement. On peut aussi décider de resynchroniser le processus principal et celui d'analyse (en vidant la pile des images) périodiquement; ceci évite en effet de saturer la pile et de provoquer une erreur et donc une interruption de l'acquisition. Enfin il est possible de synchroniser complètement les deux processus (pas d'envoi d'une image à analyser tant qu'il en reste une en cours d'analyse); cependant une telle synchronisation a peu d'intérêt car elle ne permet plus l'acquisition en temps réel.

B.2 Analyse du contour

On retrouvera une grande partie des notions abordées dans cette section dans l'article [Pécreaux et al., 2004].

Nous noterons par la suite pour chaque point du contour, indexé par i , $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ la position détectée de la membrane (correspondant à un nombre fractionnaire de pixel) et (x_i, y_i) la position correspondante sur la grille de pixels (en valeur entière de pixels).

B.2.1 Première méthode utilisée

Les diverses méthodes utilisées par d'autres groupes ont déjà été présentées au chapitre II.1 p. 57. Nous allons décrire ici les améliorations successives que nous avons apportées à l'algorithme de détection; le premier algorithme que nous avons développé présentait déjà de nettes améliorations par rapport aux méthodes ne détectant que des points ou portions du contour [Schneider et al., 1984; Bivas et al., 1987; Strey et al., 1995], ou enfin l'ensemble du contour à partir du minimum des niveaux de gris [Engelhardt et al., 1985; Faucon et al., 1989; Mitov et al., 1992; Méléard et al., 1997; Häckl et al., 1997]. La première génération de l'algorithme était l'adaptation à notre système de celui développé par H.-G. Döbereiner [Döbereiner et al., 1997; Döbereiner, 2000a]. Nous allons décrire son fonctionnement.

Le premier point

n. En effet le processeur XEON permet d'exécuter plusieurs processus en parallèle sur le même processeur.

Cas de la première image (ou de la première image après une où le contour n'a pas été trouvé) L'utilisateur définit un rectangle dans l'image où se trouve la vésicule, ainsi qu'un point approximativement au centre de la vésicule. La première étape est de trouver un point du contour ; pour cela le programme trace une ligne horizontale passant par le point donné par l'utilisateur ; le long de cette ligne, les niveaux de gris sont calculés. Ensuite sur un intervalle de 15 points, 7 points avant le point testé et 5 après, la forme du profil est approximée par une droite et la pente de cette droite mesurée (voir sur cette approximation le § A.1.3 p. 81). Ce processus est répété pour tous les points de la ligne^o. Le point testé qui a la

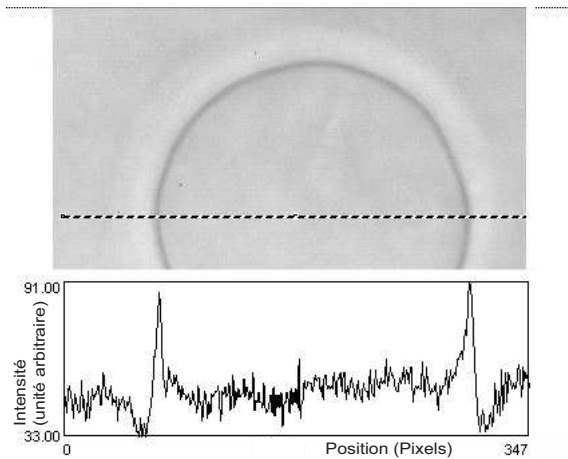


FIG. II.24 – Vésicule et profil de niveau de gris le long d'une ligne horizontale passant sensiblement par le centre de la vésicule, afin de déterminer un premier point du contour (voir § B.2.1).

plus grande pente (calculée sur 15 points) est pris comme premier point du contour (x_0, y_0) (voir fig. II.24 et II.19 p. 83). Dans le cas où on se trouve à l'image suivant une image où le contour n'a pas été trouvé, le point sensiblement au centre de la vésicule donné par l'utilisateur est remplacé par le dernier point du dernier contour détecté correctement.

Cas d'une image suivant une image où le contour a été détecté correctement Dans ce cas, le premier point du contour sera le dernier point du contour précédent.

Trouver le point suivant à partir du précédent Dans cette première version de l'algorithme, la détection est effectuée le long d'un axe vertical et d'un axe horizontal uniquement. Nous allons détailler la détection le long d'un axe horizontal. Si le dernier point reconnu est (x_i, y_i) , alors on calcule les niveaux de gris le long d'une droite horizontale passant par $(x_i, y_i \pm 1)$; le signe est choisi de telle sorte que ce

^o. On commence en fait au point 8 et on finit au point N-7, pour permettre de toujours prendre les 15 points de la même manière.

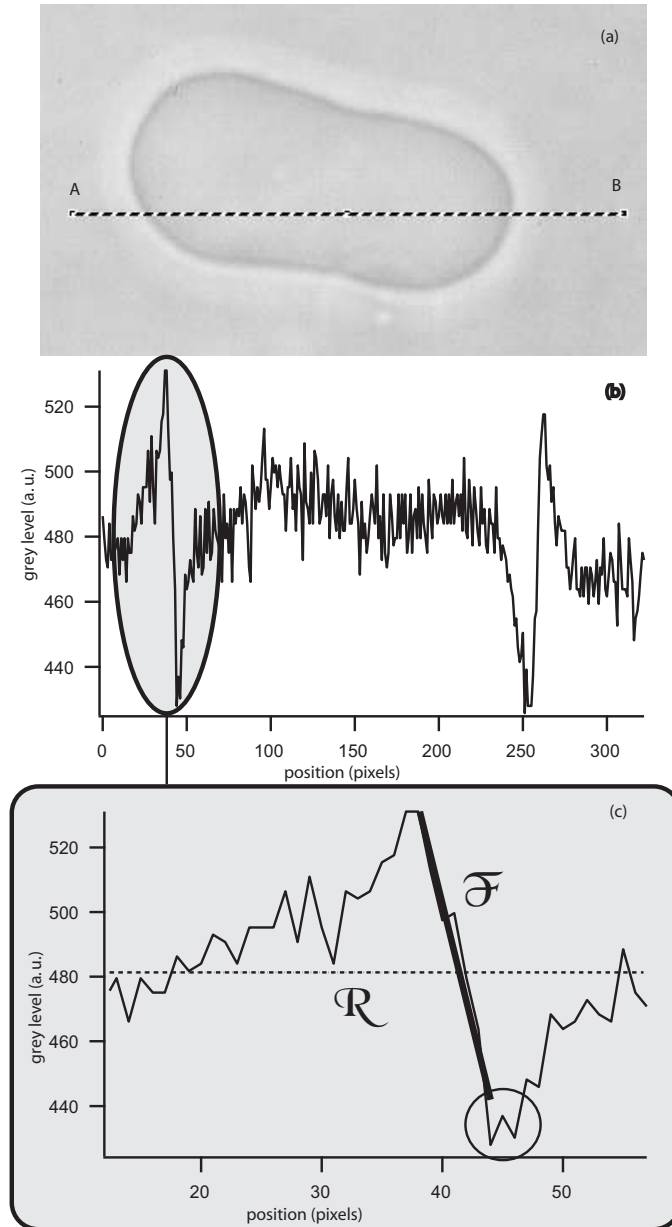


FIG. II.25 – (a) Image en contraste de phase d’une vésicule géante. La résolution est de 11 pixel par microns. (b) Profil des niveaux de gris le long de la ligne AB de l’image (a) (longueur $29.4\,\mu\text{m}$). On pourra remarquer les deux maxima de pente correspondant aux intersections avec le contour. (c) Zoom sur le profil de (b) correspondant à la zone grisée. Le profil est approché localement par une droite représentée en trait plein $\mathcal{F}$. La ligne en pointillé $\mathcal{R}$ correspond au niveau de gris moyen. L’intersection de ces deux droites $\mathcal{F}$ et $\mathcal{R}$ va donner la position du contour. On pourra remarquer à l’intérieur du cercle que le minimum d’intensité du halo autour de la vésicule peut être divisé en deux à cause du bruit de détection et conduire à une perte de précision si la membrane est localisée à partir du minimum d’intensité comme c’est le cas pour [Méléard et al., 1998; Gerbeaud, 1998] ou [Häckl et al., 1997].

point soit dans le prolongement des points du contour déjà reconnus (typiquement on se base sur les 10 derniers points et on regarde si l'ordonnée croît ou décroît). Le long de cette droite, on va approcher la forme du profil de niveaux de gris en fonction de l'abscisse par une droite ($\mathcal{F}$) sur l'intervalle $(x_i - 5, y_i \pm 1)$ $(x_i + 5, y_i \pm 1)$ (voir fig. II.25). On calcule parallèlement le niveau de gris moyen sur l'intervalle $(x_i - 15, y_i \pm 1)$ $(x_i + 15, y_i \pm 1)$; de là on obtient une droite horizontale ($\mathcal{R}$) sur un graphique représentant le niveau de gris en fonction de l'abscisse. L'intersection de ($\mathcal{R}$) et de ($\mathcal{F}$) donne le point $(\bar{x}_i, y_i \pm 1)$. On notera S_i^x , la pente de la droite ($\mathcal{F}$) (voir fig. II.25).

On reproduit la même méthode le long d'une droite verticale passant par le point $(x_i \pm 1, y_i)$ pour obtenir l'estimation $(x_i \pm 1, \bar{y}_i)$, et la pente S_i^y .

A cette étape on va comparer les pentes S_i^x et S_i^y . On estimera la position de la membrane à cet endroit provenant du cas (vertical ou horizontal) qui a donné la plus grande pente^p. Ainsi on obtient par exemple dans le cas où S_i^x domine, l'estimation $(\tilde{x}_{i+1}, \tilde{y}_{i+1}) = (x_i \pm 1, \bar{y}_i)$ pour la position de la membrane et $(x_{i+1}, y_{i+1}) = (x_i \pm 1, y_i)$ pour la position du point sur la grille de pixel qui permet l'itération suivante.

Fin de l'acquisition d'un contour Nous déterminons ainsi de proche en proche les points du contour. Le contour est considéré comme fini lorsque l'algorithme revient sur le point indexé par m (à quelques pixels près) où m vaut typiquement 10 (on suppose qu'on a numéroté les points détectés les uns après les autres de proche en proche). Prendre le point indexé par m plutôt que le premier point permet d'utiliser les points entre 1 et $m - 1$ pour permettre à l'algorithme de se stabiliser correctement sur le contour. Par ailleurs, on utilise plusieurs fois les 10 points précédents le point courant pour la détection du contour; pour les premiers points, ces points précédents sont fixées arbitrairement à des valeurs tel qu'ils forment une droite verticale avec le premier point et orientée vers les ordonnées décroissante; les points détectés en utilisant ces points fixés arbitrairement ne sont pas intégrés au contour, grâce au fait que m est plus grand ou égal à «la mémoire des points précédents» (qui contient typiquement 10 points).

Par ailleurs si l'itération pour rechercher les points du contour suivant se répète un trop grand nombre de fois, et que le nombre de points détectés comme appartenant au contour atteint une valeur limite^q, alors le contour est abandonné, non enregistré. Cette condition force les contour détectés à être clos pour être enregistrés.

Le contour enregistré Le contour enregistré est le contour commençant au point m (voir § B.2.1) et finissant au dernier point détecté. Cela permet un contour clos, et sans zone de recouvrement (où le tracé reviendrait sur des points déjà détectés).

p. Un raffinement pour éviter à l'algorithme d'osciller entre estimation par droite horizontale et estimation par droite verticale dans les zones où le contour de la vésicule fait un angle de 45° avec l'horizontale est de mettre un «retard» au changement de direction pour l'estimation. Par exemple, il faut que la pente en vertical soit 10 fois de suite la plus grande que l'estimation par droite horizontale, avant qu'on passe à l'estimation par droite verticale.

q. Cette limite paramétrable est fixée dans notre cas à $2^{12} = 4096$, sachant qu'en fonction de la taille de la vésicule le nombre de points varie de 700 à 3000.

Limitations Cette méthode a un inconvénient majeur : en effet à un moment de la reconnaissance il y a un saut discontinu dans la méthode de calcul de la position ; en effet on passe d'une détection suivant l'axe horizontal, à une détection suivant l'axe vertical. Ceci introduit un artefact dans le contour qui prend la forme d'une ou plusieurs «dents de scie». De plus lorsque le contour est incliné d'une valeur proche de 45° par rapport à l'horizontale, la reconnaissance est relativement imprécise. Ces différents points conduiront aux améliorations décrites dans le § B.2.2.

B.2.2 La méthode actuelle

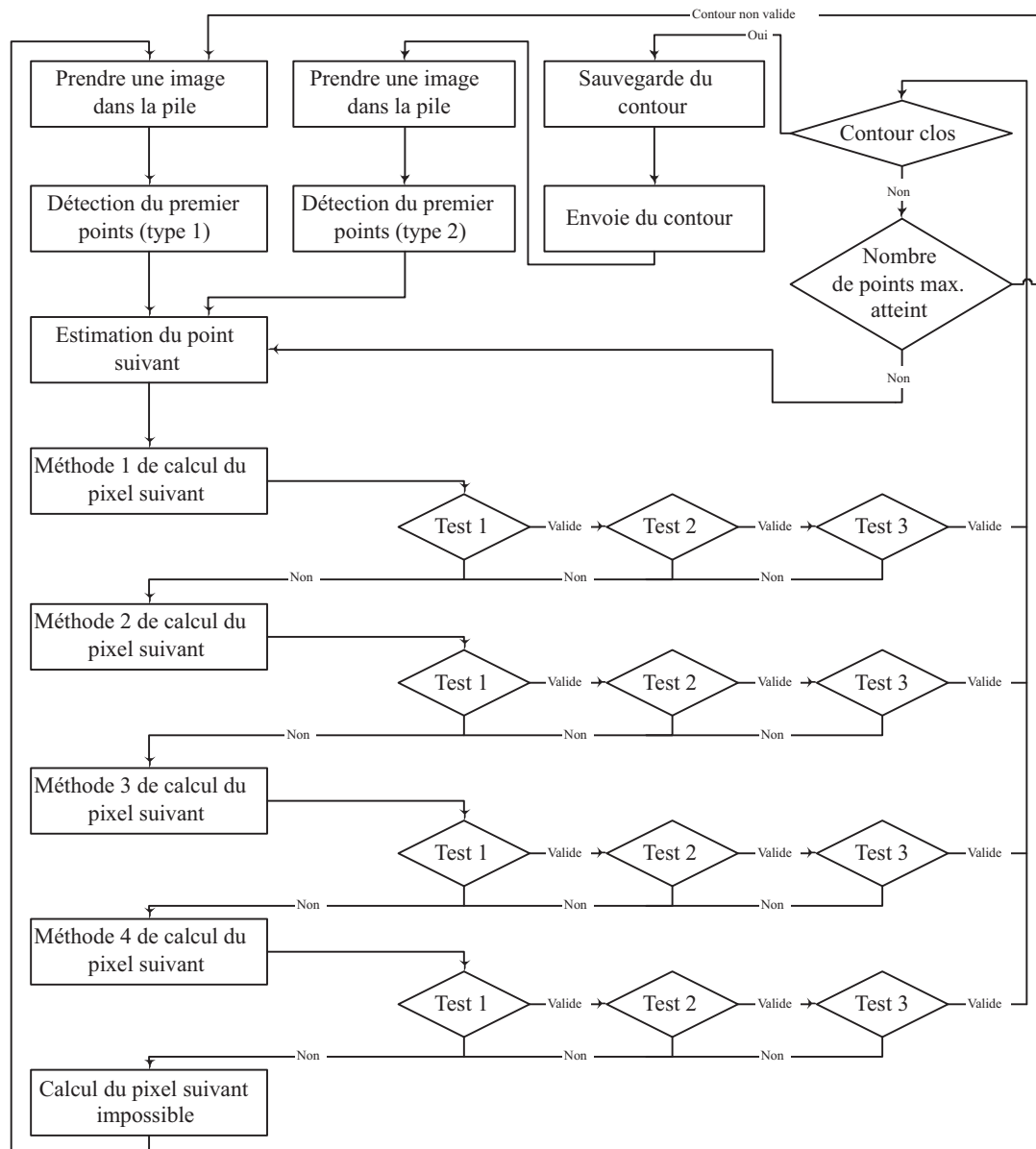


FIG. II.26 – Schéma de fonctionnement de l'algorithme actuel de reconnaissance de contour

On se reportera à la figure II.26 pour une représentation graphique du proces-

sus. La détection du premier point se fait de manière identique au processus décrit § B.2.1 p. 95.

Amélioration dans l'estimation du point suivant du contour On reproduit la détection le long des axes (Ox) et (Oy) comme indiqué au § B.2.1 p. 96. De plus on fait la même détection le long des axes diagonaux (Ov) et (Ow) (voir fig. II.27) en prenant en compte que l'espacement entre les point est maintenant de $\sqrt{2}$ plutôt que 1.

De plus, on ne va plus seulement comparer les pentes et décider de prendre une seule des estimations, mais calculer le barycentre des quatre estimations avec comme poids les valeurs des pentes. On a alors

$$\begin{aligned} \tilde{x}_{i+1} = & \left[S_i^x(x_i \pm 1) + S_i^y(\bar{x}_i) + S_i^v(\pm\sqrt{2}/2 - \bar{w}_i/\sqrt{2}) \right. \\ & \left. + S_i^w(\mp\sqrt{2}/2 + \bar{v}_i/\sqrt{2}) \right] / (S_i^x + S_i^y + S_i^v + S_i^w) \end{aligned} \quad (\text{II.2.7})$$

$$\begin{aligned} \tilde{y}_{i+1} = & \left[S_i^x(\bar{y}_i) + S_i^y(y_i \pm 1) + S_i^v(\pm\sqrt{2}/2 + \bar{w}_i/\sqrt{2}) \right. \\ & \left. + S_i^w(\pm\sqrt{2}/2 + \bar{v}_i/\sqrt{2}) \right] / (S_i^x + S_i^y + S_i^v + S_i^w) \end{aligned} \quad (\text{II.2.8})$$

Toutefois, il faut noter que cette procédure ne donne plus directement le point (x_{i+1}, y_{i+1}) qui est le point suivant sur la grille de pixel (à distinguer du point du contour détecté avec une plus grande précision que le pixel et calculé comme expliqué ci-dessus). Cette méthode présente l'avantage certain de donner une grande précision sur l'amplitude des fluctuations ; néanmoins il a fallu développer une procédure pour le calcul du point suivant sur la grille de pixel, un arrondi de l'estimation ne donnant pas forcément un pixel différent du point de départ.

L'utilisation d'une droite pour approcher la forme locale du contour, plutôt que simplement prendre le maximum ou le minimum en intensité nous a permis d'atteindre une précision d'un dixième de pixel sur l'amplitude des fluctuations soit 86 nm, à comparer avec les valeurs d'autres auteurs pour des expériences de reconnaissance de contour, 250 nm pour Sackmann et al. [Engelhardt et al., 1985; Häckl et al., 1997] ou de 100 nm pour Faucon et al. [Faucon et al., 1989]. De plus, contrairement ce derniers auteurs, nous ne choisissons pas le maximum ou le minimum comme position de la membrane (ce qui n'est pas correct par ailleurs, voir § A.1.3 p. 81), ce qui nous permet d'éviter les artefacts, lorsque cet extremum se divise en deux comme on peut le voir fig. II.25 p. 97.

Obtention de la nouvelle position en pixel Pour ce faire, le programme va essayer successivement plusieurs méthodes pour estimer (x_{i+1}, y_{i+1}) . L'obtention du nouveau point sur la grille de pixel peut se faire simplement en vérifiant que ce point (x_{i+1}, y_{i+1}) n'est pas identique au précédant (x_i, y_i) , ou comporter en plus des tests plus complexes ; ce sera l'objet du § B.2.2 p. 102.

- La première méthode testée est bien sûr celle qui paraît la plus évidente ; arrondir les coordonnées de $(\tilde{x}_{i+1}, \tilde{y}_{i+1})$ à l'entier le plus proche. Néanmoins dans un nombre non négligeable de cas, cela redonne (x_i, y_i) .

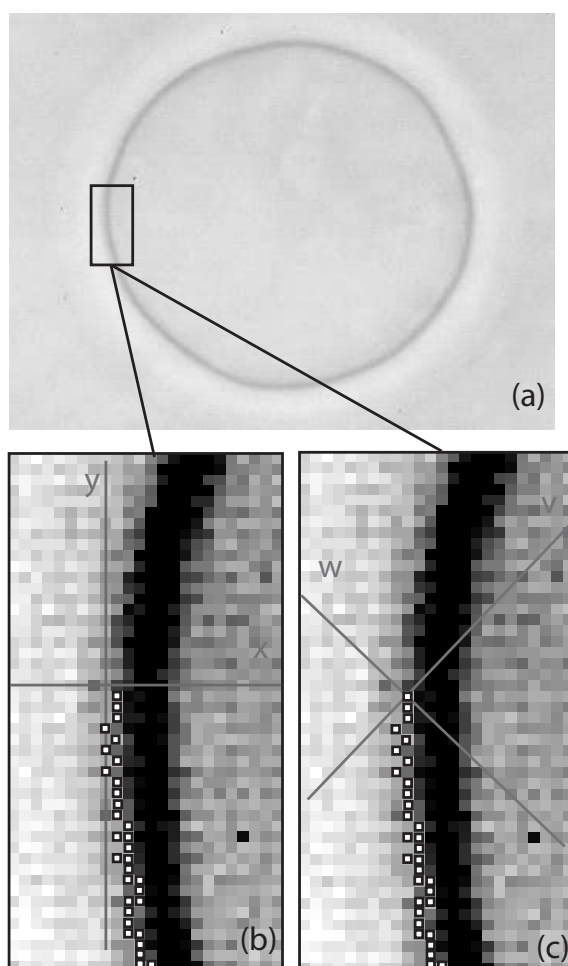


FIG. II.27 – *Un zoom sur le contour de la vésicule de l'image (a). Le contraste a été augmenté pour permettre une compréhension plus facile. Les pixels dans b) et c) marqués d'un carré blanc avec contour noir sont les points déjà détectés du contour de la vésicule. (b) Deux estimations de la position sont calculées le long des axes notés ici x et y . (c) Deux autres estimations sont calculées le long des axes v et w .*

- La seconde méthode consiste à déterminer si l’une des pente S_i^x , S_i^y , S_i^v , S_i^w est nettement plus grande que les autres^r, alors on avancera dans la direction perpendiculaire à la droite le long de laquelle a été pris ce profil de plus grande pente. Il reste à déterminer le sens. Celui-ci sera déterminé en fonction du sens de déplacement de la majorité des 10 derniers points.
- La troisième méthode consiste à calculer le vecteur $\vec{d}$ normalisé entre les points $(\tilde{x}_{i-10}, \tilde{y}_{i-10})$ et $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$. Si on nomme $\vec{x}$, $\vec{y}$ les vecteurs unitaires, $\vec{v}$, et $\vec{w}$ les vecteurs de norme $\sqrt{2}$ correspondant aux directions des droites (Ox) , (Oy) , (Ov) , (Ow) respectivement, il existe parmi ces vecteurs et leurs opposés, un vecteur faisant un angle inférieur à $22,5^\circ$ avec $\vec{d}$. On fera donc un pas donné par ce vecteur dans la direction de ce vecteur en partant de (x_i, y_i) ^s.
- La quatrième et dernière méthode consiste à calculer les coordonnées en x et y du vecteur reliant le point du contour d’index $i - 10$ et celui d’index i . Si cette abscisse est suffisamment grande (si elle est positive) ou suffisamment petite (si elle est négative)^t, un pas est fait vers les x positifs, respectivement vers les x négatifs. On procède de même sur l’axe (Oy) .

Si aucune de ces quatre méthodes n’aboutit, l’algorithme est incapable de déterminer le point suivant, il reprend alors la détection du premier point (§ B.2.1 p. 95), avec comme point «central» de la vésicule, la dernière position en pixel calculée.

Tests appliqués à une nouvelle position en pixel Nous avons mis au point trois tests afin de détecter si le contour revient sur ses pas ou fait quelques pas « en arrière » avant de reprendre la bonne direction. On notera (x_{i+1}^t, y_{i+1}^t) le point candidat pour être (x_{i+1}, y_{i+1}) , proposé par l’une des méthodes décrites dans le § B.2.2 p. 100.

- Lors du premier test, on vérifie que le point candidat (x_{i+1}^t, y_{i+1}^t) est différent du point précédent (x_i, y_i) .
- En second test, on calcule le vecteur $\vec{t}$ entre les points (x_i, y_i) et (x_{i+1}^t, y_{i+1}^t) . On calcule $\vec{t}_0$ entre les points (x_i, y_i) et $(x_i - 1, y_i - 1)$. On prend ensuite l’angle (en valeur absolue) entre $\vec{t}_0$ et $\vec{t}$, et si cet angle est inférieur à une valeur donnée comme paramètre de la reconnaissance, alors le point proposé n’est pas valide. Dans nos expériences nous avons fixé cet angle limite à 70° (valeur optimale trouvée empiriquement).
- Enfin, en troisième test, avec un retard de r points, nous allons construire une bande de largeur l autour du contour. Pour ce faire à l’étape où l’on trouve $i+1$, on va rajouter tous les points de la droite passant par (x_{i-r}, y_{i-r}) et perpendiculaire au vecteur joignant (x_{i-r-1}, y_{i-r-1}) et (x_{i-r}, y_{i-r}) , et dont la distance à (x_{i-r}, y_{i-r}) est inférieure à l . (En pratique, cela consiste à créer un

r. Si les niveaux de gris sont directement dans la représentation par des entiers fournie par la carte d’acquisition, les distances en pixel, alors on considérera qu’une pente est nettement supérieure aux autres si elle est plus grande d’au moins 2 niveaux de gris par pixel.

s. Il est à noter que la longueur du pas fait 1 pour les axes (Ox) et (Oy) , et $\sqrt{2}$ pour les axes (Ov) et (Ow) .

t. en pratique, nous avons fixé cette limite à 0.25 pixels.

tableaux représentant l'image et à cocher tous les pixels qui font partie de la bande). Le test en lui-même consiste à tracer un cercle de rayon donné autour du point (x_{i+1}^t, y_{i+1}^t) et à regarder si dans ce cercle se trouvent des points de la bande. Si oui, alors le point proposé est invalide.

On notera que le troisième test n'est pas utilisé systématiquement lors des expériences que nous expliciterons dans la suite de ce manuscrit.

Fin et Sauvegarde Là aussi, on garde les procédures déjà présentes dans la première version de l'algorithme (voir § B.2.1 p. 98 et suivants).

B.2.3 Avantages et pistes d'amélioration

Cette version de l'algorithme permet un gain très sensible en résolution et on peut donc détecter les amplitudes des fluctuations avec une précision du dixième de pixel.

Il existe deux pistes principales pour améliorer encore la reconnaissance de contour.

Détection en coordonnées locales La première serait de faire une détection comme nous avons fait ici mais en ne calculant le profil que suivant une droite qui joindrait le centre du cercle osculateur de la courbe et le point courant (soit une normale locale à la courbe). Cela apparaît néanmoins relativement difficile à mettre en place. Il faudrait un premier contour qui serve de base pour reconnaître ensuite un deuxième.

Détection en 3D Une seconde solution serait de prendre une représentation des niveaux de gris de l'image de la vésicule en nappe 3D (représentant les niveaux de gris en z , avec les coordonnées de l'image en x et y), et de «fitter» localement le sillon représentant le contour. Cela éviterait de privilégier certaines directions (en prenant les profils suivant des directions perpendiculaires) Cette solution permettrait une reconnaissance plus précise et sans l'inconvénient des directions privilégiées. Néanmoins elle requiert une puissance de calcul de l'ordinateur plus grande pour être faite en temps réel^u. Cette direction a déjà commencé à être explorée par Henriksen et al. [Henriksen, 2003].

u. Elle semble en effet impossible sur le matériel dont nous disposons actuellement, qui est déjà poussé dans ses limites par l'algorithme actuel.

Chapitre II.3

Traitement et analyse



U TRAVERS DE CE CHAPITRE, nous allons décrire l'analyse des données qui suit l'acquisition des contours et va nous permettre de déduire les paramètres physiques sur la vésicule observée. Dans un premier temps, nous verrons les systèmes de tri utilisés pour sélectionner uniquement les contours corrects et retirer des contours analysés les contours présentant des aberrations ; ensuite nous détaillerons l'analyse de Fourier et tout spécialement l'analyse du spectre de fluctuations à l'équilibre.

A. Sélection des contours

Malgré un dispositif de reconnaissance de contours optimisé, tant optiquement (voir § A p. 78), qu'électroniquement (voir § A.2 p. 84) et sur le plan de l'algorithme (voir § B p. 92), il apparaît nécessaire de trier les séries de contours reconnus afin d'en extraire les contours aberrants, dus soit à une perturbation de la vésicule étudiée (poussière très diffusante, fluctuation hors focus par exemple), soit à un défaut introduit par l'algorithme lui-même (retour sur une partie du contour déjà reconnue par exemple).

A.1 Par le périmètre du contour

A.1.1 Principe

Le principe est très simple : on suppose que la longueur du contour reste constante durant toute l'expérience, ce qui paraît une hypothèse raisonnable lorsqu'on travaille à nombre de lipides constant. On pourrait objecter que d'après [Fournier et al., 2001], la longueur mesurée à la résolution optique du microscope n'est pas constante, bien que le nombre de lipides soit fixé ; néanmoins comme les vésicules sont assez grosses, les périmètres sont assez grands, et les variations dues au défroissage des fluctuations de longueurs d'onde inférieure à l'échelle optique restent faibles comparées à ces longueurs. En effet, on prend comme limite de résolution du microscope le critère

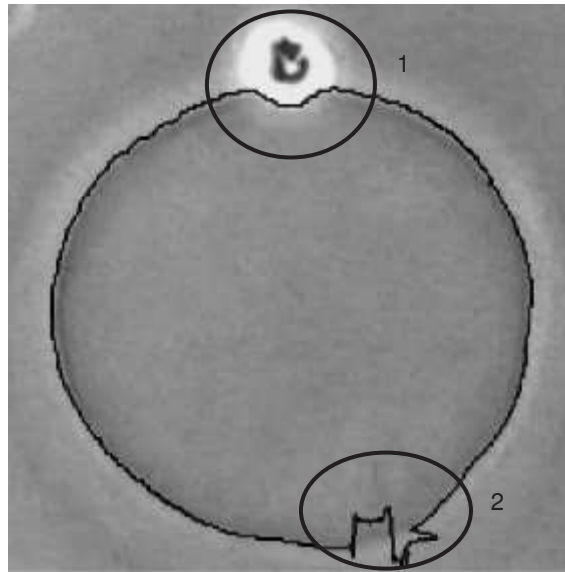


FIG. II.28 – Image acquise avec une caméra analogique d’une vésicule d’EPC/BR, avec le contour reconnu en noir (dessiné ici avec une résolution de un pixel seulement, pour se superposer à l’image de la vésicule). On peut noter les deux défauts les plus courants éliminés par le test sur la longueur du contour : l’ellipse 1 indique une poussière très diffusante qui provoque une déformation du contour ; l’ellipse 2 indique une zone où le contour est apparemment plus flou et qui n’est pas correctement reconnue ; ce «flou» est dû à une fluctuation en dehors du plan focal.

d'Abbe [Inoué and Spring, 1997, pages 37-41], c'est à dire que le plus grand vecteur d'onde des fluctuations non résolu optiquement est $q_x^c = \frac{2*NA}{\lambda}$, NA étant l'ouverture numérique et λ la longueur d'onde. D'après [Helfrich and Servuss, 1984], en appliquant le calcul du spectre de fluctuation à une dimension (voir § B.1.5 p. 117), on obtient une longueur stockée dans les fluctuations en dessous de la résolution optique (q_x^{max} étant une coupure moléculaire)

$$L_\mu = \frac{R}{2} \frac{k_b T}{\sigma} \int_{q_x^c}^{q_x^{max}} q_x^2 \left[\frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right] \quad (\text{II.3.1})$$

où T est la température absolue, σ la tension, κ le module de rigidité de courbure et R le rayon de la vésicule. Dans notre cas, prenant les valeurs qui donnent la plus grande valeur pour L_μ , soit $NA = 1.4$, $\lambda = 700 \text{ nm}$ (coupure du filtre anticalorique de la lampe), $\sigma = 10^{-8} \text{ N/m}$, $\kappa = 10^{-19} \text{ J}$, $R = 10 \mu\text{m}$ et $q_x^{max} = 1/(4 \times 10^{-10}) \text{ m}^{-1}$ (rayon de la tête polaire d'un lipide DiacylPhosphatidylCholine), on obtient $L_\mu \simeq 0.64 \mu\text{m}$, soit une longueur de l'ordre de 1.0% du périmètre. On peut donc appliquer ce test sans crainte de biaiser la statistique en sélectionnant un certains type de fluctuation, à condition que les bornes de sélection du contour soient grandes devant cette valeur, ce qui est tout à fait le cas, comme nous le verrons au § suivant.

A.1.2 Implémentation

On calcule donc la longueur moyenne des contours $\langle L \rangle$ sur l'ensemble de la série, et on compare la longueur L du contour avec $\langle L \rangle$; si l'écart est supérieur à 10% alors le contour est éliminé de la série.

La longueur du contour est calculée ainsi :

$$ds_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} \quad (\text{II.3.2})$$

où $i \in [1; N]$ indexe les points du contours dont les coordonnées cartésiennes sont $(x_i; y_i)$. Le contour étant clos on a :

$$ds_0 = ds_N = \sqrt{(x_1 - x_N)^2 + (y_1 - y_N)^2} \quad (\text{II.3.3})$$

D'où pour la longueur du contour :

$$L = \sum_{i=1}^N ds_i \quad (\text{II.3.4})$$

A.1.3 Limites

Cette méthode de tri reste toutefois assez grossière et ne permet l'élimination que de contours fortement perturbés; en effet la longueur des contours fluctue un peu au cours du temps (car on ne mesure qu'une longueur visible et celle-ci comme

nous l'avons vu ci-dessus, n'est pas exactement constante) ; il n'est donc pas possible de faire une sélection sur une gamme de longueur trop étroite.

L'avantage reste que cette technique ne fait que l'hypothèse du nombre de lipides constants, et s'applique quel que soit l'analyse qui suit.

A.2 En bornant les valeurs des amplitudes des modes

indexvaleurs bornées des modes

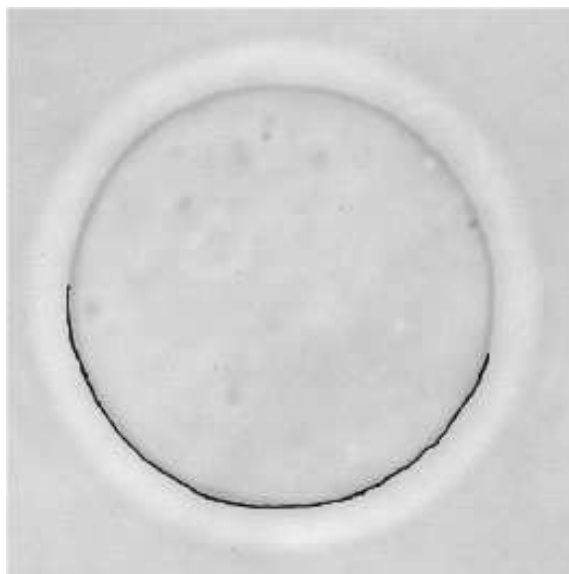


FIG. II.29 – Image (acquise par la caméra numérique) d'une vésicule de SOPC, ainsi que le contour détecté par l'algorithme, en noir (tracé à la résolution d'un pixel seulement). On a ici le défaut le plus courant éliminé par le test sur l'amplitude des modes ; en effet il arrive que l'algorithme revienne sur ses pas (dans le cas où on n'utilise pas le troisième test donné § B.2.2 p. 102). De plus la longueur du contour peut rester proche de la longueur moyenne, ce qui fait que de tels contours ne sont pas éliminés par le test de longueur (voir § A.1 p. 105)

A.2.1 Principe et implémentation

Le principe de ce test va se baser sur le calcul des modules de la série de Fourier complexe (voir § B p. 110). On va imposer une valeurs maximale au coefficient c_n . Si un ou plusieurs modes franchissent cette valeur, alors le contour est éliminé.

Le test est pratiqué juste après la projection sur les séries de Fourier. Le test que nous utilisons est

$$\forall n \in [1; 40] \quad |c_n| < 1 \quad (\text{II.3.5})$$

Ceci correspond à interdire que l'amplitude d'un mode soit supérieure au rayon de la vésicule, ce qui est une condition grossière, mais suffisante pour éliminer les aberrations telle celle présentée fig. II.29. Nous avons aussi testé des conditions plus contraignantes jusqu'à

$$\forall n \in [1; 40] \quad |c_n| < 0.15 \quad (\text{II.3.6})$$

Néanmoins l'application de cette dernière contrainte sur des vésicules éloignées de la forme sphérique n'est pas possible car les contours valables sont alors éliminés. Sur des vésicules quasi-sphériques, cette condition donne des résultats efficaces dans le tri des contours.

A.2.2 Limites

La limite de l'efficacité de ce test vient du fait que les valeurs des modes ne peuvent être bornées de manière trop étroite ; en effet nous souhaitons rester sensible aux fluctuations et pouvoir appliquer notre analyse à des vésicules non sphériques. Par ailleurs, ce test ne s'applique que si on utilise une analyse de Fourier (§ B).

A.3 Distribution Gaussienne des valeurs des modes

Cette troisième méthode de sélection était en quelque sorte un raffinement du test précédent (§ A.2). Nous l'avons employée au début de nos expériences, mais nous l'avons maintenant abandonnée pour des raisons explicitées plus loin.

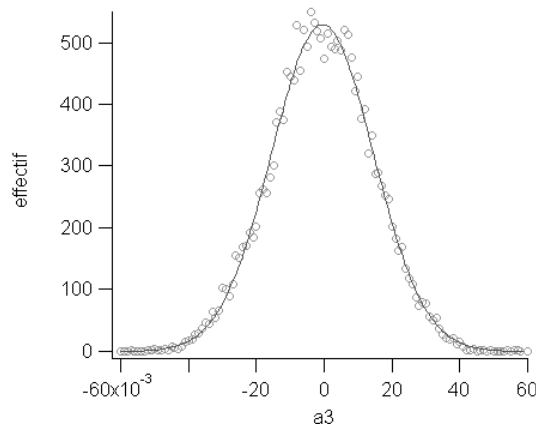


FIG. II.30 – On a tracé ici pour le mode a_3 (voir § B), la distribution des valeurs sur la série (représenté par les cercles), et l'approximation par une gaussienne (tracé en noir).

A.3.1 Principe et implémentation

On va supposer que la répartition des valeurs des amplitudes d'un mode est gaussienne. Après l'analyse de Fourier (voir § B), on va tracer pour chaque mode la distribution des valeurs, l'approcher par une gaussienne (voir fig. II.30), et éliminer les contours qui donnent des valeurs en queue de courbe, soit les valeurs des modes s'écartant notablement des valeurs de la distribution gaussienne.

A.3.2 Limites

Cette méthode qui apparaît comme un raffinement de la méthode précédente, fait toutefois l'hypothèse d'une répartition gaussienne des valeurs des coefficients autour d'une valeur moyenne; cette hypothèse est valide dans le cas de contours à l'équilibre thermodynamique, mais ne semble plus du tout justifiée dans le cas des vésicules actives comme celles présentées au chapitre III.4 p. 181. C'est pour cette dernière raison que nous avons rapidement abandonné cette méthode de tri; on n'utilise donc plus que les deux premières méthodes exposées.

B. Analyse de Fourier

B.1 Spectre de fluctuations - Comparaison avec les expressions pour des membranes planes

B.1.1 Principe et implémentation

Le principe est de calculer les premiers termes de la série complexe de Fourier du rayon r en fonction de l'angle polaire θ , et de calculer les fluctuations à partir de l'écart quadratique moyen du module.

Passage en coordonnées polaires On définit la longueur (curviligne) du pas comme

$$ds_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} \quad (\text{II.3.7})$$

et comme le contour est clos on pose (N le nombre de points du contour) :

$$ds_0 = ds_N = \sqrt{(x_1 - x_N)^2 + (y_1 - y_N)^2} \quad (\text{II.3.8})$$

Pour cela nous allons dans un premier temps calculer les coordonnées du centre de la vésicule $(x_c; y_c)$, défini comme la moyenne de tous les points du contours, pondérée pour chaque point par la distance le séparant du précédent et du suivant. Puis nous passerons en coordonnées polaires avec pour centre le centre de la vésicule. Reprenant

les notations du § A.1.2 p. 107 (voir fig. II.31) :

$$x_c = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N x_i \times (ds_{i-1} + ds_i) \quad (\text{II.3.9})$$

On peut écrire une relation similaire pour y_c . On définit alors les coordonnées

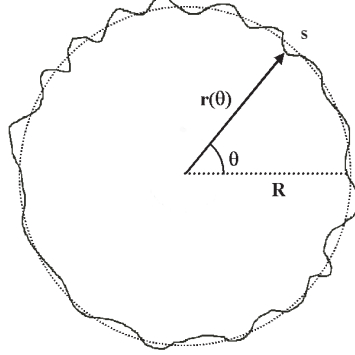


FIG. II.31 – Schéma d'une vésicule fluctuante avec les notations utilisées.

centrées $\tilde{x}_i = x_i - x_c$ et de même pour $\tilde{y}_i$. On passe alors en coordonnées polaires $(r_i; \theta_i)$ avec :

$$r_i = \sqrt{\tilde{x}_i^2 + \tilde{y}_i^2} \quad (\text{II.3.10})$$

et

$$\theta_i = \begin{cases} \arctan \frac{\tilde{y}_i}{\tilde{x}_i} & \text{if } \tilde{x}_i > 0 \\ \arctan \frac{\tilde{y}_i}{\tilde{x}_i} + \pi & \text{if } \tilde{x}_i < 0 \text{ and } \tilde{y}_i > 0 \\ \arctan \frac{\tilde{y}_i}{\tilde{x}_i} - \pi & \text{if } \tilde{x}_i < 0 \text{ and } \tilde{y}_i < 0 \end{cases} \quad (\text{II.3.11})$$

Projection sur les séries de Fourier Ensuite, nous calculons les coefficients de la série de Fourier correspondant au développement :

$$r(\theta) = R \left(1 + \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + b_n \sin(n\theta) \right) \quad (\text{II.3.12})$$

soit

$$r^0 = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N \left(\frac{r_i + r_{i+1}}{2} \right) (\theta_{i+1} - \theta_i) \quad (\text{II.3.13})$$

$$a_n = \frac{1}{\pi r^0} \sum_{i=1}^N [r_i \cos(n\theta_i) + r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1})] \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (\text{II.3.14})$$

$$b_n = \frac{1}{\pi r_0} \sum_{i=1}^N [r_i \sin(n\theta_i) + r_{i+1} \sin(n\theta_{i+1})] \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (\text{II.3.15})$$

Enfin on calcule le module du développement en série complexe de Fourier

$$|c_n| = \sqrt{a_n^2 + b_n^2} \quad (\text{II.3.16})$$

et on s'intéresse aux fluctuations de ce dernier

$$\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n| \rangle^2 \quad (\text{II.3.17})$$

Cette moyenne est faite dans notre cas sur un nombre important de contours (typiquement 2000) pris à 25 ou 30 contours par seconde (respectivement pour l'utilisation d'une caméra analogique, et digitale).

Ensuite il faut disposer d'un modèle théorique pour les fluctuations des membranes, permettant de calculer le spectre de fluctuation. Dans le cadre de l'hypothèse ergodique, on va alors comparer les valeurs prévues par la théorie et les valeurs mesurées expérimentalement.

B.1.2 Passage des séries de Fourier aux transformées de Fourier - Membrane de taille finie

Les modèles théoriques pour décrire les fluctuations des membranes donnent l'expression des fluctuations autour du plan moyen en transformée de Fourier spatiale, alors que les expériences nous donnent les fluctuations des modes de Fourier. Prenant en compte l'aspect fini du système, on peut écrire que la transformée de Fourier de $u(x)$ est, avec $a = 2\pi\langle R \rangle$:

$$\tilde{u}(q_x) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-a/2}^{a/2} u(x) \exp(-iq_x x) dx \quad (\text{II.3.18})$$

(i symbolise le nombre imaginaire tel que $i^2 = -1$) alors que les coefficients des termes de la série de Fourier complexe, normalisés par le rayon, s'écrivent

$$c_n = \frac{\tilde{c}_n}{\langle R \rangle} = \frac{1}{\langle R \rangle} \frac{2}{a} \int_{-a/2}^{a/2} u(x) \exp\left(-i \frac{2\pi n}{a} x\right) dx \quad (\text{II.3.19})$$

On peut alors écrire

$$\tilde{u}(q_x) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-a/2}^{a/2} \frac{1}{2} \sum_{n=-\infty}^{n=\infty} c_n \exp\left(in \frac{x}{\langle R \rangle}\right) \exp(-iq_x x) dx \quad (\text{II.3.20})$$

et en inversant la somme et l'intégrale (on suppose que $u(x)$ possède les propriétés mathématiques requises pour cela)

$$\tilde{u}(q_x) = \frac{1}{\sqrt{a}} \frac{1}{2} \sum_{n=-\infty}^{n=\infty} \tilde{c}_n \int_{-a/2}^{a/2} \exp\left(in \frac{x}{\langle R \rangle}\right) \exp(-iq_x x) dx \quad (\text{II.3.21})$$

et finalement

$$\tilde{u}(q_x) = \frac{1}{\sqrt{a}} \frac{1}{2} \sum_{n=-\infty}^{n=\infty} \tilde{c}_n \pi 2 \langle R \rangle \frac{\sin(\pi(q_x \langle R \rangle - n))}{\pi(q_x \langle R \rangle - n)} \quad (\text{II.3.22})$$

soit

$$\tilde{u}(q_x) = \frac{1}{\langle R \rangle} \sqrt{\frac{\pi \langle r \rangle}{2}} \tilde{c}_n \quad \text{pour} \quad q_x = \frac{n}{\langle R \rangle} \quad (\text{II.3.23})$$

Il vient alors immédiatement que, en passant au module,

$$\langle |u|^2(q_x) \rangle = \frac{\pi \langle R \rangle^3}{2} (\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n| \rangle^2) \quad \text{pour} \quad q_x = \frac{n}{\langle R \rangle} \quad (\text{II.3.24})$$

avec la propriété donnée par la théorie que $\langle u(q_x) \rangle = 0$. On peut ainsi obtenir les fluctuations telles qu'elles sont calculées dans les modèles théoriques à partir des fluctuations de modes des séries de Fourier.

B.1.3 Incidence de la courbure sur le début du spectre de fluctuation théorique

Dans les paragraphes suivants, on note u la distance entre la membrane et le plan moyen de la membrane (voir fig. II.33 p. 118).

Les spectres de fluctuations disponibles pour les membranes actives sont calculés à ce jour uniquement en géométrie plane. Les expressions exactes pour le cas d'une vésicule sphérique passive ont été calculées [Milner and Safran, 1987]; néanmoins notre but ultime étant l'étude des membranes actives, nous utiliserons les expressions en géométrie plane pour les membranes passives aussi, afin de permettre un comparaison aisée des résultats dans les deux cas. Nous allons montrer maintenant qu'aux petits vecteurs d'onde, les effets de la forme courbée de la membrane sont en fait dominés par la tension.

On peut dans le cas des vésicules passives^a regarder si l'omission de la courbure due à la forme sphérique de la vésicule a une incidence importante sur le début du spectre. Nous allons étudier dans un premier temps la partie du hamiltonien due à la tension $\mathcal{H}_\sigma$, puis la partie dépendant de la courbure $\mathcal{H}_\kappa$. Nous noterons $\hat{\mathcal{H}}$ le hamiltonien dans le cas où la courbure de la membrane est prise en compte, et $\mathcal{H}$ dans le cas plan qui est celui de la théorie. Dans le cas plan, considérant une coupe dans le plan diamétral de la vésicule^b, nous avons pour le terme de tension :

$$\mathcal{H}_\sigma = \frac{1}{2} \sigma \int_0^{2\pi \langle R \rangle} (\nabla u)^2 dx = \frac{1}{2} \sigma \int_0^{2\pi \langle R \rangle} \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 dx \quad (\text{II.3.25})$$

a. Ce résultat se généralise immédiatement aux vésicules actives, compte tenu du fait que les termes «passif» du hamiltonien, sont aussi présents dans le cas actif; avec bien sûr l'hypothèse que les termes actifs ne comportent pas de contribution importante due à la courbure.

b. donc on analyse un contour à une dimension plongé dans un plan.

x représente la coordonnée d'abscisse sur le segment représentant la position moyenne de la membrane ; en effet le fait de se trouver en système fini conduit à faire les intégrations sur le périmètre du cercle $\mathcal{C}$ représentant la position moyenne du contour de la vésicule.

Dans le cas courbe, u désigne alors la distance entre le contour et le cercle $\mathcal{C}$, prise le long d'un rayon de ce cercle. On a en représentation polaire, avec pour origine le centre de la vésicule:

$$r = \langle R \rangle + u(s) \quad (\text{II.3.26})$$

s est l'abscisse curviligne le long du cercle $\mathcal{C}$, d'où $x = \theta \langle R \rangle$, avec θ l'angle polaire. On peut alors écrire le terme de tension :

$$\widehat{\mathcal{H}}_\sigma = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi \langle R \rangle} (\nabla u)^2 ds = \frac{1}{2} \sigma \int_0^{2\pi \langle R \rangle} \frac{1}{r^2} \left(\frac{\partial u}{\partial \theta} \right)^2 ds \quad (\text{II.3.27})$$

et on peut écrire en supposant $u \ll \langle R \rangle$, et donc $r \simeq \langle R \rangle$

$$\widehat{\mathcal{H}}_\sigma = \frac{1}{2} \sigma \int_0^{2\pi \langle R \rangle} \left(\frac{\partial u}{\partial s} \right)^2 ds = \mathcal{H}_\sigma \quad (\text{II.3.28})$$

Ainsi à l'ordre le plus bas, la forme courbée de la membrane ne rajoute pas de terme correctif à l'énergie due à la tension.

Le terme de courbure dans le cas plan est :

$$\mathcal{H}_\kappa = \frac{1}{2} \kappa \int_0^{2\pi \langle R \rangle} c(x)^2 dx \quad (\text{II.3.29})$$

où $c(x)$ désigne la courbure au point x . Bien qu'étant dans le cas plan on peut poser la paramétrisation naturelle

$$\begin{cases} x = \langle R \rangle \theta \\ y = u(\theta) \end{cases} \quad (\text{II.3.30})$$

Dans le cas plan on a :

$$\mathcal{H}_\kappa = \frac{1}{2} \kappa \int_0^{2\pi \langle R \rangle} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx \quad (\text{II.3.31})$$

En supposant que $\langle R \rangle \gg \frac{\partial u}{\partial \theta}$, ce qui est vrai pour les modes de grandes longueur d'onde auxquels nous nous intéressons, il vient dans le cas où on prend en compte la courbure :

$$\widehat{\mathcal{H}}_\kappa = \frac{1}{2} \kappa \int_0^{2\pi \langle R \rangle} c(\theta)^2 ds \quad (\text{II.3.32})$$

A l'aide des formules classiques de la courbure d'un arc en coordonnées polaires, on obtient :

$$c(\theta) = \frac{1}{\langle R \rangle} + \frac{u}{\langle R \rangle^2} - \frac{\frac{\partial^2 u}{\partial \theta^2}}{\langle R \rangle^2} \quad (\text{II.3.33})$$

Ayant toujours $s = \langle R \rangle \theta$ on a alors finalement (omettant un terme constant dans l'énergie)

$$\widehat{\mathcal{H}}_\kappa = \frac{1}{2} \kappa \int_0^{2\pi \langle R \rangle} \left[\left(\frac{\partial^2 u}{\partial s^2} \right)^2 - \frac{2u}{\langle R \rangle^2} \frac{\partial^2 u}{\partial s^2} + \frac{u^2}{\langle R \rangle^4} \right] ds \quad (\text{II.3.34})$$

où le premier des trois termes est celui qui apparaît déjà pour une membrane plane dans $\mathcal{H}_\kappa$. Nous souhaitons évaluer les deux termes supplémentaires dans l'énergie et vérifier s'il contribuent aux petits modes. Pour cela, comparons le terme de tension (qui domine le terme de courbure à petit mode), avec ces deux termes complémentaires dans l'énergie de courbure^c. On s'est placé ici dans le cas d'une vésicule passive, sachant que ces considérations sont aisément étendues au cas actif, car ces termes demeureront^d. Le terme de tension domine les corrections si :

$$\frac{\sigma}{2}q_x^2 \gg \frac{\kappa}{\langle R \rangle^2}q_x^2 \quad \text{soit} \quad \langle R \rangle \gg \sqrt{2\frac{\kappa}{\sigma}} \quad (\text{II.3.35})$$

pour le second terme
et pour le troisième terme si

$$\frac{\sigma}{2}q_x^2 \gg \frac{\kappa}{2\langle R \rangle^4} \quad \text{soit} \quad q_x \gg \sqrt{\frac{\kappa}{\langle R \rangle^4 \sigma}} \quad (\text{II.3.36})$$

Numériquement, en prenant $\langle R \rangle = 10^{-5}$ m, $\kappa = 4 \times 10^{-20}$ J et $\sigma = 10^{-7}$ N/m dans les équations II.3.36 et II.3.35, on obtient

$$q_x \gg 6 \times 10^3 \text{ m}^{-1} \quad \text{et} \quad \langle R \rangle \gg 9 \times 10^{-7} \text{ m} \quad (\text{II.3.37})$$

Ces conditions sont donc toujours vérifiées dans notre cas. Ainsi la forme courbée de la vésicule ne devrait pas contribuer aux petits modes.

B.1.4 Topologie des vésicules - comparaison des spectres de fluctuations pour une membrane plane et en géométrie sphérique

Il faut également prendre en compte le fait que la vésicule est fermée sur elle-même. En effet, cet aspect n'est pas pris en compte dans la théorie pour les membranes planes. Cet effet pourrait expliquer le décalage entre le spectre théorique et les mesures expérimentales aux petits modes (voir fig. II.39 p. 124) ; car ce sont les modes de plus grande longueur d'onde (plus petits modes) qui vont être le plus affectés par cet effet.

On peut comparer le spectre de fluctuations obtenu pour la transformée de Fourier d'une coupe dans le plan diamétral de la vésicules, dans la modélisation plane des vésicules et dans la modélisation par les harmoniques sphériques en utilisant les expressions de Faucon et al. [Faucon et al., 1989] ; il est à noter que cette dernière modélisation est très proche de celle proposée par [Engelhardt et al., 1985] et [Häckl et al., 1997]. Si $r^s(\theta, \phi, t)$ est l'équation de la vésicule en coordonnées sphériques, on peut écrire [Faucon et al., 1989, eq. 4]:

$$r^s(\theta, \phi, t) = R^s [1 + u^s(\theta, \phi, t)] \quad (\text{II.3.38})$$

c. D'après [Manneville, 1999, pages 22 et suivantes], on peut directement travailler sur ces termes car ils apparaissent dans le spectre de fluctuation, simplement en transformée de Fourier par rapport à la forme dans le hamiltonien.

d. Il faut supposer alors que les autres termes du hamiltonien ne donneront pas lieu à des corrections dues à la courbure qui soient plus importantes que celles-ci.

et d'après [Faucon et al., 1989, eq. 12] on peut séparer la partie statique, qui correspond à la forme à l'équilibre $u_0^s(\theta, \phi, t)$ et la partie dynamique due aux fluctuations $\delta u^s(\theta, \phi, t)$

$$u^s(\theta, \phi, t) = u_0^s(\theta, \phi, t) + \delta u^s(\theta, \phi, t) \quad (\text{II.3.39})$$

On va se placer dans le cas de vésicules purement lipidiques et comparer $\langle |c_n|^2 \rangle$, le carré du module de la série de Fourier complexe dans notre modélisation (voir § A.3.1 p. 110 et § B.1.2 p. 112) et la même grandeur $\langle |c_n^s|^2 \rangle$ obtenue depuis la modélisation faite par Faucon et al. [Faucon et al., 1989]. On a d'après [Faucon et al., 1989, eq. 21]

$$\delta u(\theta, \phi, t) = \sum_{n=0}^{n_{max}} \sum_{m=-n}^{m=n} U_n^m(t) Y_n^m(\theta, \phi) \quad (\text{II.3.40})$$

où les $Y_n^m(\theta, \phi)$ sont les harmoniques sphériques définies comme

$$Y_n^m(\theta, \phi) = (-1)^m \sqrt{\frac{2n+1}{4\pi} \frac{(n-m)!}{(n+m)!}} P_n^m(\cos \theta) e^{im\phi} \quad (\text{II.3.41})$$

Les P_n^m sont les polynômes de Legendre associés, définis par

$$P_n^m(u) = \sqrt{(1-u^2)^m} \frac{d^m}{du^m} P_n(u) \quad (\text{II.3.42})$$

[Cohen-Tannoudji et al., 1973, eq. 67 p. 694]. Les P_n sont les polynômes de Legendre définis par exemple par la formule de Rodrigue [Beyer, 1978, p. 557-560] :

$$P_n(u) = \frac{(-1)^n}{2^n n!} \frac{d^n}{dx^n} \{ (1-x^2)^n \} \quad (\text{II.3.43})$$

On peut définir c_p^s par

$$|c_p^s| = \left| \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \delta u(\theta, \phi, t) e^{ip\phi} d\phi \right| \quad (\text{II.3.44})$$

comme

$$\int_{-\pi}^{\pi} Y_n^m(\theta, \phi) e^{ip\phi} d\phi = 2 \frac{\sin(\pi(p-m))}{\pi(p-m)} \quad (\text{II.3.45})$$

non nul uniquement pour $p = m$, et $P_n^m(u) = 0$ si $m > n$, on a

$$|c_p^s| = \left| \sum_{n=p}^{n_{max}} 2P_n^p(0) (-1)^p \sqrt{\frac{2n+1}{4\pi} \frac{(n-p)!}{(n+p)!}} U_n^p(t) \right| \quad (\text{II.3.46})$$

On a de plus pris $\theta = \frac{\pi}{2}$ car on regarde la vésicule dans le plan équatorial. Comme on a [Faucon et al., 1989, eq. 33],

$$\langle |U_n^m(t)|^2 \rangle = \frac{kT}{\kappa} \frac{1}{(n-1)(n+2) [\bar{\sigma} + n(n+1)] + 2(2\bar{\sigma} - \bar{p})} \quad (\text{II.3.47})$$

avec

$$\bar{p} = \frac{\Delta p R^3}{\kappa} + 2c_0 R \quad \text{et} \quad \bar{\sigma} = \frac{\sigma R^2}{\kappa} + 2c_0 R + \frac{c_0^2 R^2}{2} \quad (\text{II.3.48})$$

On a finalement l'expression

$$\begin{aligned} \langle |c_p^s|^2 \rangle &= \sum_{n=p}^{n=n_{max}} (P_n^p(0))^2 \frac{2n+1}{4\pi} \frac{(n-m)!}{(n+m)!} \\ &\times \frac{kT}{\kappa} \frac{1}{(n-1)(n+2)[\bar{\sigma} + n(n+1)] + 2(2\bar{\sigma} - \bar{p})} \end{aligned} \quad (\text{II.3.49})$$

La suite du calcul est effectuée numériquement.

Pour le cas plan, on a simplement d'après l'eq. II.3.24 p. 113 et l'équation modélisant une vésicule purement lipidique (eq. III.3.2 p. 169)

$$\langle |c_p|^2 \rangle = \frac{kT}{\pi \langle r \rangle^3 \sigma} \left(\frac{\langle r \rangle}{p} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + \frac{p^2}{\langle r \rangle^2}}} \right) \quad (\text{II.3.50})$$

On a calculé à la fig. II.32 le rapport des modules calculés à partir des expressions en géométrie plane c_p et à partir des harmoniques sphériques c_p^s

$$\rho = \frac{|c_p|^2}{|c_p^s|^2} \quad (\text{II.3.51})$$

On notera que au-delà du mode 5, le rapport ρ est supérieur à 0.98 et que donc l'erreur commise est plus faible que l'erreur expérimentale (voir § B.2 p. 124). On pourra donc dès le mode 5 utiliser les modèles développés pour les membranes planes pour analyser nos spectres de fluctuation. On peut rapprocher ce graphique montrant que la théorie en membrane plane sous-estime l'amplitude des premiers modes, avec le fait que fig. II.39 p. 124, les valeurs expérimentales des premiers modes sont supérieures à celles calculées à partir de la théorie des membrane planes. Enfin, ayant montré que la courbure n'était pas responsable de cet écart au paragraphe précédent, on peut donc proposer que c'est le fait que la vésicule soit «refermée sur elle-même», non pris en compte dans la théorie en membrane plane et qui, explique le décalage des points expérimentaux et de la théorie pour les premiers modes.

B.1.5 Contour observé dans le plan équatorial de la vésicule

Les spectres de fluctuations sont donnés pour une nappe plane (voir fig. II.33), par les fluctuations de l'écart $u(\mathbf{r}_\perp, t)$ ^e entre la position de la membrane et le plan (xOy) qui représente la position moyenne de la membrane. Pour obtenir le spectre de fluctuations d'une coupe de la vésicule au niveau de l'équateur, ce qui est effectivement mesuré expérimentalement, il faut considérer une coupe de la membrane selon un plan parallèle à (xOz) . On peut donc considérer qu'on observe la fonction $u(x, t)$ dans le plan (xOz) . Les spectres de fluctuations mesurés expérimentalement doivent être comparés à $\tilde{u}(q_x, t)$, obtenu par la transformation de Fourier inverse de $\tilde{u}(\mathbf{q}_\perp, t)$ donné par la théorie

$$\tilde{u}(q_x, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{u}(q_x, q_y, t) dq_y \quad (\text{II.3.52})$$

e. $\mathbf{r}_\perp$ est le vecteur position dans le plan (xOy) .

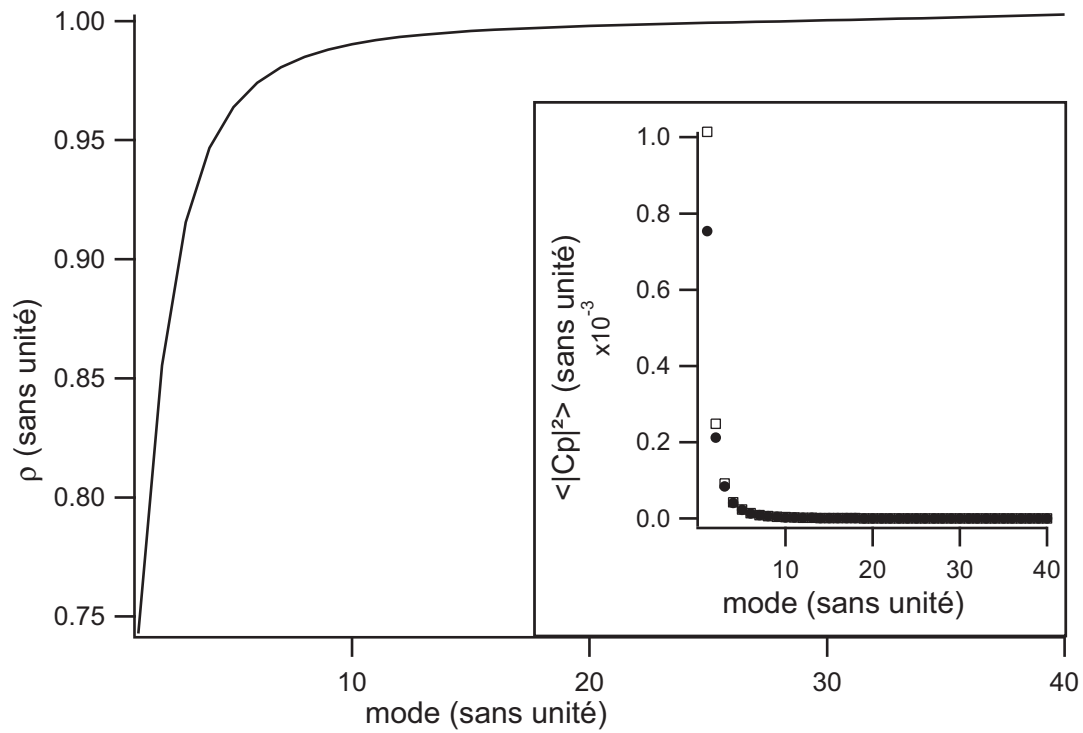


FIG. II.32 – Rapport ρ des modules des amplitudes des modes en géométrie plane et en géométrie sphérique en fonction du numéro du mode. Dans l'encart, graphe des valeurs de $\langle |c_n|^2 \rangle$ (cas plan) : les cercles pleins et $\langle |c_n^s|^2 \rangle$ (cas sphérique) (carrés vides) en fonction du mode n . On a pris une tension $\sigma = 10^{-8} \text{ N/m}$, une rigidité de courbure $\kappa = 20 \times 10^{-20} \text{ J}$, un rayon de vésicule $\langle R \rangle = 10 \mu\text{m}$, une courbure spontanée de $c_0 = 0$, et une valeur $\Delta p = 2\sigma/\langle R \rangle$, qui correspond au saut de pression à travers la sphère représentant la position moyenne de la vésicule ayant une tension σ . On remarquera que les deux courbes sont superposées sauf pour les tout premiers modes.

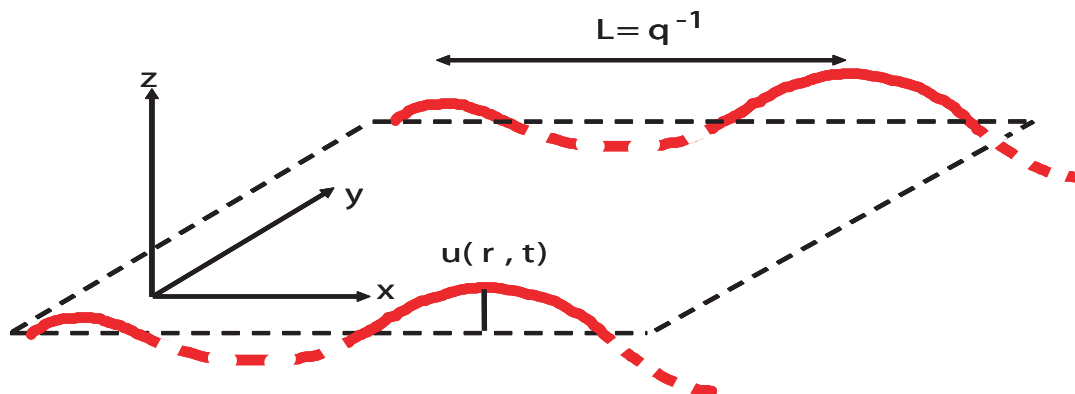


FIG. II.33 – Schéma d'une membrane plane fluctuant autour de son plan moyen.

Les expressions correspondant au cas passif et actif sont données dans les chapitres consacrés respectivement aux expériences dans ces deux cas.

B.1.6 Intégration en temps

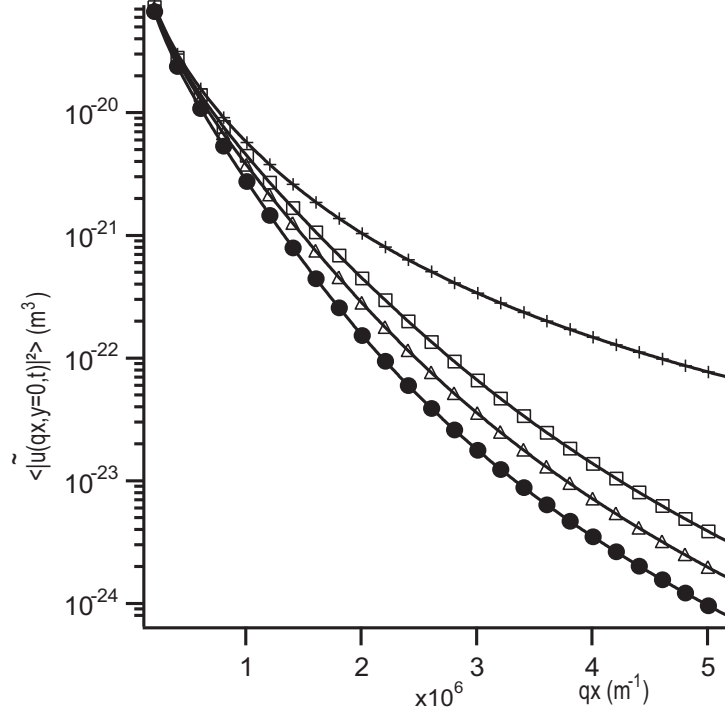


FIG. II.34 – *Effet de l'intégration en temps sur le spectre de fluctuation (Simulation numérique) pour une membrane à l'équilibre (passive) calculé à partir de l'eq. III.3.6 p. 170. On a pris une tension $\sigma = 10^{-7}$ N/m et un module de rigidité de courbure $\kappa = 10^{-19}$ J. Les + correspondent à un temps d'intégration infiniment court, les trois autres courbes correspondent aux temps : $\square$ $\tau = 0.008$ s, $\triangle$ $\tau = 0.016$ s et $\bullet$ $\tau = 0.03$ s.*

Comme nous l'avons déjà mentionné au § A.2 p. 84, la caméra réalise une intégration en temps de l'image durant l'ouverture de l'obturateur. Ceci doit aussi être intégré à l'analyse du spectre. Nous allons donner ici les étapes du calcul du spectre de fluctuations corrigé de cet effet.

On part de l'équation de Langevin de la membrane fluctuante (où τ_m et f le temps caractéristique des fluctuations et une fonction caractérisant le bruit thermique, éventuellement le bruit actif (*shot noise*, voir [Prost and Bruinsma, 1996]), ainsi que le couplage avec la diffusion des protéines dans la membrane dans le cas actif. Ces fonctions dépendent du type de membrane et seront explicitées dans les chapitres consacrés à chacune :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_\perp) = f(\mathbf{q}_\perp, t) \quad (\text{II.3.53})$$

connaissant $\tau_m(\mathbf{q}_\perp)$ et $\langle f(\mathbf{q}_\perp, t)f(\mathbf{q}'_\perp, t') \rangle$, on calcule

$$\langle u(\mathbf{q}_\perp, t)u(\mathbf{q}'_\perp, t') \rangle \quad \text{avec} \quad t' > t \quad (\text{II.3.54})$$

où on pourra négliger les termes transitoires. Et finalement on écrit, notant $\bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)$ la fonction $u(\mathbf{q}_\perp, t)$ après intégration en temps par la caméra :

$$\langle \bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)\bar{u}(\mathbf{q}'_\perp, t) \rangle = \frac{2}{\tau^2} \int_{t_1=t}^{t_1=t+\tau} \int_{t_2=t_1}^{t_2=t+\tau} \langle u(\mathbf{q}_\perp, t_1)u(\mathbf{q}'_\perp, t_2) \rangle dt_2 dt_1 \quad (\text{II.3.55})$$

où τ est le temps d'intégration de la caméra.

Les expressions dans le cas des vésicules sont données au § III.3.9 p. 170 dans le cas passif. La figure II.34 montre que cette correction liée à l'intégration des fluctuations doit absolument être intégrée à l'analyse, car elle est importante dès les premiers modes où on peut analyser les spectres pour les temps d'obturation utilisés (33 ms, et 16 ms, 8 ms).

B.1.7 Précision de la détection ; limitation des spectres

Nous avons déterminé dans les paragraphes précédents que nous ne pouvions pas analyser les 5 premiers modes, avec la théorie des membranes planes. Nous allons maintenant évaluer quelle est la précision sur l'amplitude des modes à laquelle nous accédons, ainsi que les effets qui vont venir limiter l'analyse des spectres aux grands q_x .

Précision calculée sur un objet fixe Afin de déterminer le «bruit de fond» en amplitude dû à la chaîne de détection (voir B.2.2 p. 99), nous avons pris des séries de contours sur une tache d'encre séchée sur du verre ; en effet, dans ce cas il n'y a alors aucune fluctuation. On observe alors un spectre de fluctuation quasi-constant à $10^{-22} m^3$ ou en dessous, sauf aux tout premiers modes, puis pour des valeurs plus grande de q_x une légère remontée du spectre que nous allons expliquer dans le paragraphe suivant (voir fig. II.35). On a donc ainsi déterminé le seuil de sensibilité en amplitude de $\langle |\bar{u}(q_x)|^2 \rangle$, soit à $10^{-22} m^3$.

Limite sur la longueur d'onde des fluctuation due à la détection discrète en pixels Si on regarde précisément le fonctionnement de l'algorithme de détection décrit au § B.2.2 p. 99, on notera que si par exemple on se trouve dans une région où la membrane est verticale, et qu'on suppose que les points détectés précédemment sont vers les ordonnées plus petites, alors la direction qui aura la plus grande pente sur le profil de niveau de gris sera (Ox) car le profil sera pris perpendiculairement à la membrane. Ainsi dans l'estimation finale cette contribution aura le plus grand poids. On aura une estimation pour l'ordonnée du point suivant : $\tilde{y}_{i+1}^y = y_i + 1$, où $(x_i; y_i)$ est la position en pixel où on se trouve actuellement. Les deux estimations suivant les directions diagonales contribueront aussi à donner des estimations pour l'ordonnées du point suivant de l'ordre de 1 pixel au-dessus du point actuel. Ainsi comme on peut le voir sur la figure II.36 p. 122, on se retrouve à ne pas pouvoir

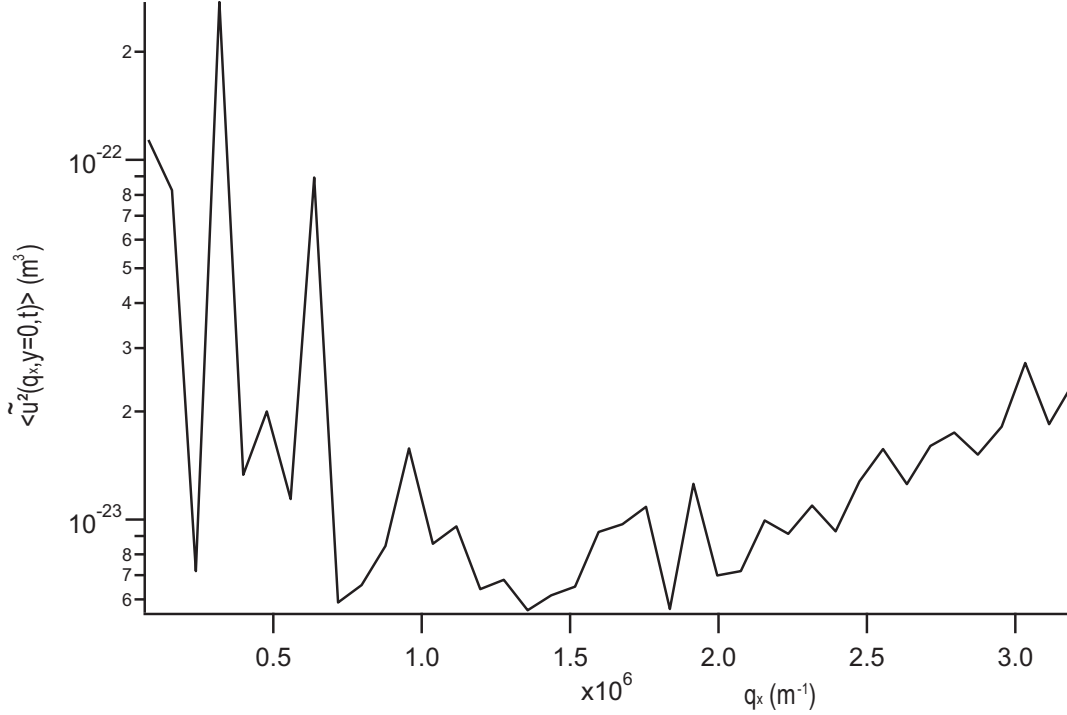


FIG. II.35 – *Spectre de fluctuations obtenu pour une goutte d'encre séchée sur une lame de verre. Cela nous permet de calibrer le bruit de fond dans la reconnaissance.*

détecter correctement des fluctuations de longueur d'onde inférieure à 4 pixels, ce qui correspond pour notre résolution de 11 pixel/ μm , à une valeur de q_x maximale de $2.75 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$.

Conséquence de la résolution finie en amplitude Comme nous l'avons explicité au § B.2.2 p. 99, nous avons une résolution en amplitude de 0.1 pixel ; cela signifie que la position de la membrane a une composante aléatoire de même amplitude. De plus, la détection de la position de la membrane se fait de façon discrète (pixel par pixel) et n'est donc pas continue. Il a été montré pour les polymères biologiques que cela introduisait un composante dans le spectre de fluctuation croissante en n , le numéro du mode, et dominante aux grands modes [Gittes et al., 1993] (voir fig. II.37). On peut faire une analyse similaire pour les membranes. En effet notre définition des fluctuations est similaire à celle de la variance de l'amplitude c_n . Ainsi le bruit de détection contribue de la manière suivante:

$$\langle |u_{mes}(qx, y = 0)|^2 \rangle = \langle |u_{th}(qx, y = 0)|^2 \rangle + \frac{\pi \langle R \rangle^3}{2} \text{var}(c_n) \quad (\text{II.3.56})$$

où u_{mes} correspond aux fluctuations mesurées, et u_{th} au spectre fourni par la théorie (prenant en compte les différents effets mentionnés précédemment). Le dernier terme correspond à la variance comme elle est calculée au § B.2 p. 124. On a représenté cette contribution calculée dans le cas particulier d'une vésicule à la fig. II.38 p. 123. On notera que cette remontée due à la résolution finie est observée expérimentalement comme le montre la figure II.40 p. 125. Le bruit aléatoire lié à la résolution

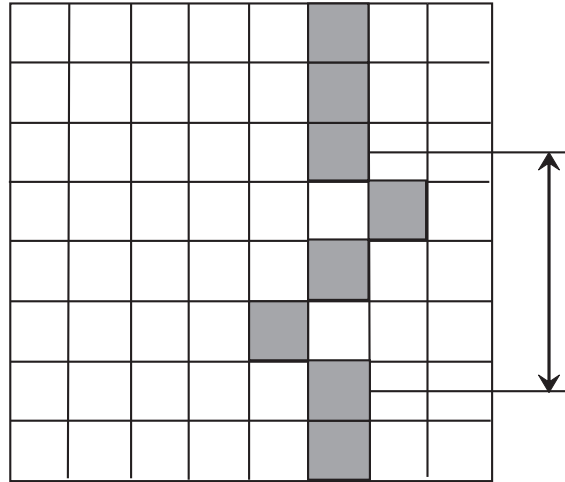


FIG. II.36 – Représentation schématique de la fluctuation de plus courte longueur d'onde détectable avec notre dispositif expérimental. La grille représente les pixels de l'image ; en gris on a les pixels qui appartiennent au contour (moyennant un arrondi au pixel près des coordonnées du contour)

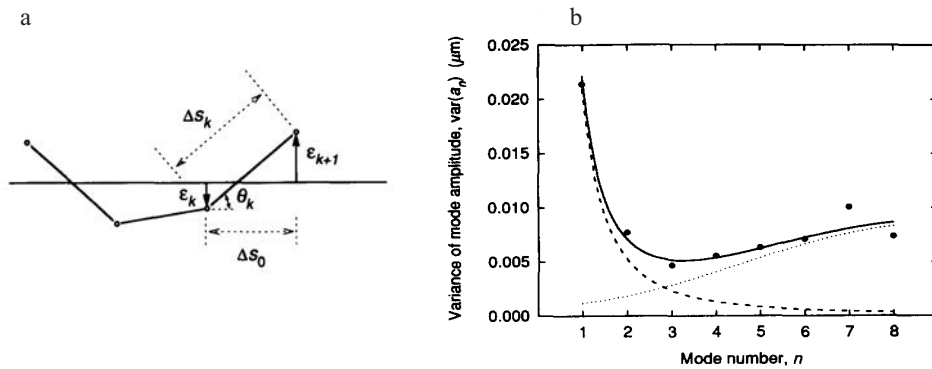


FIG. II.37 – (a) Modélisation du bruit provenant de la résolution finie en amplitude, le segment étant la trajectoire (ici d'un filament d'actine) à reconnaître et la ligne brisée le résultat de la reconnaissance. (b) Effet de cette résolution finie sur le spectre de fluctuation (en séries de Fourier discrètes prise sur la longueur du filament, avec à ses extrémité une conditions aux limites périodique) (d'après [Gittes et al., 1993])

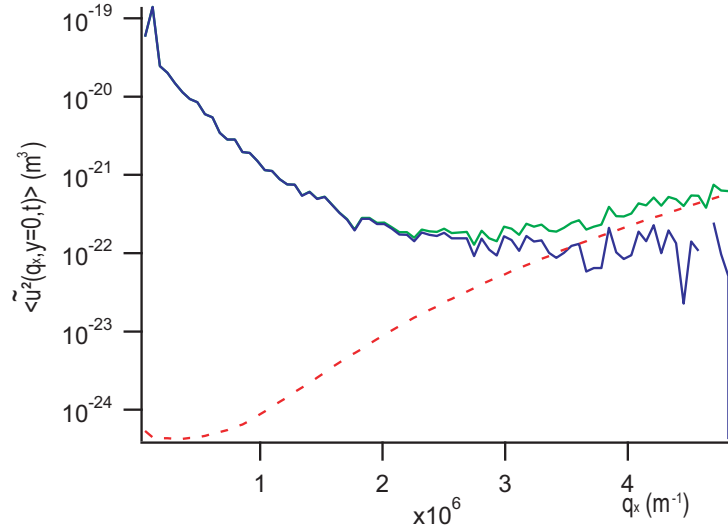


FIG. II.38 – Bruit dû à la résolution finie sur une vésicule de SOPC. En vert courbe brute sortant de l'analyse, on y distingue la remontée. En bleu la courbe après soustraction du bruit. En pointillés rouge le bruit calculé d'après les expressions qui seront développées au § B.2

finie de détection explique bien la remontée systématique des spectres aux grands q_x .

Il faut noter que cet effet est général et devrait affecter les spectres dès que la détection se fait de manière discrète. La limitation de l'analyse aux grands q_x dépend donc directement de la résolution de détection et justifie aussi l'utilisation de notre technique. Plutôt que la détection par le minimum. Nous avons pu vérifier pratiquement que toute augmentation du bruit de l'image contribuait à cette remontée aux grands q_x .

B.1.8 Domaine de validité de la comparaison du spectre obtenu expérimentalement avec les modèles théoriques

En conclusion, d'après les considérations des paragraphes précédents, et les observations expérimentales, les modèles théoriques développés pour les membranes planes devraient permettre de rendre compte de nos spectres expérimentaux au-delà du mode 5^f; les modes les plus élevés souffrent quant à eux d'effets qui viennent masquer leurs valeurs (voir § B.1.7 p. 120) et ne peuvent donc pas être approchés par nos expressions théoriques. On pourra retrouver ces considérations sur les figures II.39 et II.40 p. 125. On se cantonnera donc à l'analyse de la gamme intermédiaire des q_x , après les cinq premiers modes, et tant que l'amplitude est supérieure

f. En effet, l'erreur sur les premiers modes vient d'une mauvaise modélisation de la topologie fermée de la surface de la vésicule par la théorie développée sur les membranes planes; il apparaît donc logique que la limite soit exprimée en numéro de mode n et non en vecteur d'onde q_x .

à quelques 10^{-22} m^3 , ou tant que l'on ne se trouve pas dans la région de *cross-over* avec la remontée à grands q_x . Soit par exemple pour la figure II.40 on prendra $0.9 \times 10^6 \text{ m}^{-1} < q_x < 2.5 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$.

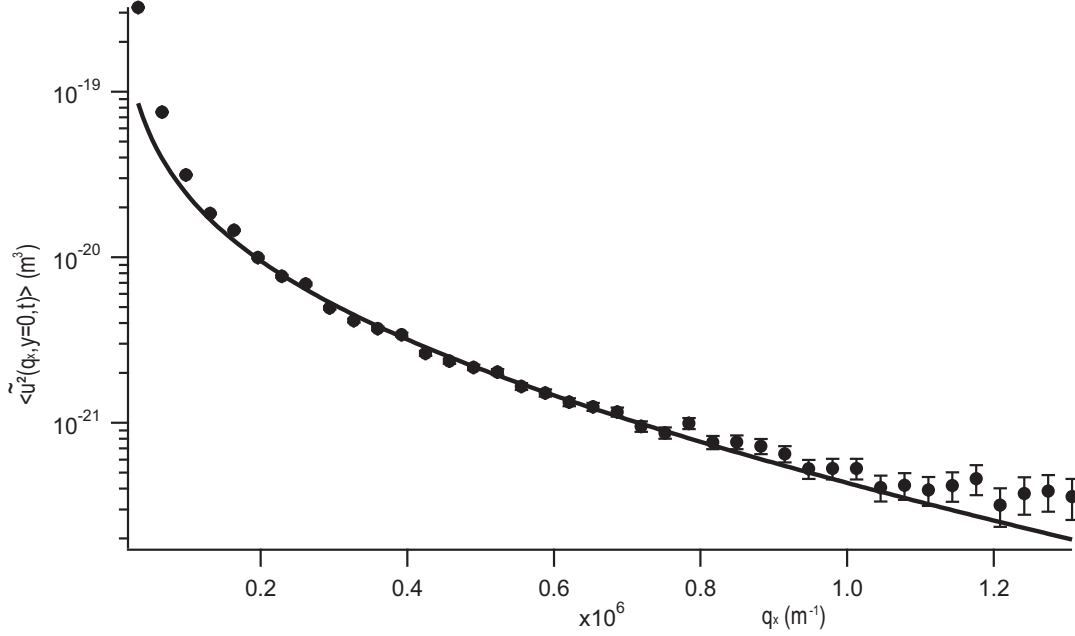


FIG. II.39 – Tracé de l'amplitude des fluctuations $\langle \tilde{u}^2(q_x, y = 0, t) \rangle$ en fonction du vecteur d'onde q_x pour une vésicule de SOPC pur. Les barres d'erreurs ont été calculées comme indiqué au § B.2. La ligne correspond au spectre théorique passif, prenant en compte l'intégration en temps de la caméra, explicité au § B.1.6 p. 119. On note que les premiers points sont mal représentés par nos expressions théoriques, ainsi que les derniers points (voir § B.1 p. 110).

B.2 Erreurs de mesure sur le spectre de fluctuation

Le calcul des erreurs sur les mesures de la tension et du module de rigidité de courbure est rarement explicité dans les articles. En général les auteurs choisissent un paramètre caractérisant la dispersion des mesures (il n'y a pas de *fit* du spectre de fluctuation, mais un calcul pour chaque mode de la valeur des paramètres correspondante). Ainsi la comparaison des résultats entre les différentes techniques est difficile. Pour cela nous avons développé un calcul systématique des erreurs prenant en compte l'imprécision sur l'amplitude comme source d'erreur (voir § B.1.7 p. 120). On peut supposer que l'erreur sur la position $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ est modélisée par une gaussienne de moyenne nulle^g et de variance σ_0^2 . Dans un premier temps, nous calculons

g. ce qui revient à ignorer les erreurs systématiques.

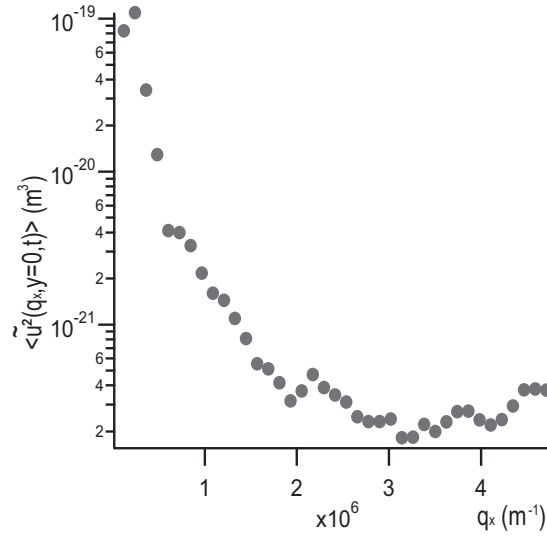


FIG. II.40 – Tracé de l'amplitude des fluctuations $\langle \bar{u}^2(q_x, y = 0, t) \rangle$ en fonction du vecteur d'onde q_x pour une vésicule de SOPC:CHOL 1:1 molaire. On observe très nettement à la fin du spectre une remontée due à la reconnaissance discrète (voir § B.1.7 p. 120).

le centre du contour $(\tilde{x}_c, \tilde{y}_c)$ par l'équation

$$\tilde{x}_c = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N \tilde{x}_i \times (ds_{i-1} + ds_i) \quad (\text{II.3.57})$$

et l'équation similaire pour $\tilde{y}_c$, avec

$$S = \sum_{i=1}^N s_i \quad \text{and} \quad s_i = \sqrt{(\tilde{x}_{i+1} - \tilde{x}_i)^2 + (\tilde{y}_{i+1} - \tilde{y}_i)^2} \quad (\text{II.3.58})$$

L'erreur sur $\tilde{x}_c$ est alors une gaussienne de moyenne nulle et de variance σ_0^2 , et identiquement pour y_c . Les coordonnées centrées sont alors $\hat{x}_i = \tilde{x}_i - \tilde{x}_c$ et $\hat{y}_i = \tilde{y}_i - \tilde{y}_c$. Il vient pour $\hat{x}_i$ la variance

$$\sigma_{\hat{x}_i} = \sigma_{\hat{y}_i} = \sqrt{2}\sigma_0 \quad (\text{II.3.59})$$

L'étape suivante est le passage en coordonnées polaires. Pour le point $(\hat{x}_i, \hat{y}_i)$, ses coordonnées polaires (r_i, θ_i) sont données par

$$r_i = \sqrt{\hat{x}_i^2 + \hat{y}_i^2} \quad (\text{II.3.60})$$

et

$$\theta_i = \begin{cases} \arctan \frac{\hat{y}_i}{\hat{x}_i} & \text{if } \hat{x}_i > 0 \\ \arctan \frac{\hat{y}_i}{\hat{x}_i} + \pi & \text{if } \hat{x}_i < 0 \text{ and } \hat{y}_i > 0 \\ \arctan \frac{\hat{y}_i}{\hat{x}_i} - \pi & \text{if } \hat{x}_i < 0 \text{ and } \hat{y}_i < 0 \end{cases} \quad (\text{II.3.61})$$

D'après [Neuilly and CETAMA, 1998, p. 532-537] les écarts-type sur le rayon et l'angle polaire de chaque point du contour sont respectivement :

$$\sigma_{r_i} = \sqrt{2}\sigma_0 \quad (\text{II.3.62})$$

et

$$\sigma_{\theta_i} = \frac{\sqrt{2}\sigma_0}{r_i} \quad (\text{II.3.63})$$

ainsi que les covariances :

$$\text{cov}(r_i, \theta_j) \simeq \delta_{ij} \frac{2\sigma_0^2}{r_i} \quad (\text{II.3.64})$$

$$\text{cov}(r_i, r_j) \simeq 0 \quad \text{for } i \neq j \quad (\text{II.3.65})$$

$$\text{cov}(\theta_i, \theta_j) \simeq 0 \quad \text{for } i \neq j \quad (\text{II.3.66})$$

avec l'hypothèse que l'erreur sur chaque point est indépendante. On utilise les équations suivantes pour calculer les rayons moyens et les coefficients des séries de Fourier ; on suppose que le point $i = 0$ et $i = N$ coïncident ainsi que les points $i = N + 1$ et $i = 1$.

$$R = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N \left(\frac{r_i + r_{i+1}}{2} \right) (\theta_{i+1} - \theta_i) \quad (\text{II.3.67})$$

$$a_n = \frac{1}{\pi R} \sum_{i=1}^N (r_i \cos(n\theta_i) + r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1})) \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (\text{II.3.68})$$

$$b_n = \frac{1}{\pi R} \sum_{i=1}^N (r_i \sin(n\theta_i) + r_{i+1} \sin(n\theta_{i+1})) \frac{\theta_{i+1} - \theta_i}{2} \quad (\text{II.3.69})$$

Ce qui nous conduit aux équations suivantes pour les déviations standards :

$$\begin{aligned} \sigma_R^2 = & \sum_{i=1}^N \left(\frac{\theta_{i+1} - \theta_{i-1}}{4\pi} \right)^2 2\sigma_0^2 + \sum_{i=1}^N \left(\frac{r_{i-1} - r_{i+1}}{4\pi} \right)^2 \frac{2\sigma_0^2}{r_i^2} \\ & + \sum_{i=1}^N \frac{\theta_{i+1} - \theta_{i-1}}{4\pi} \frac{r_{i-1} - r_{i+1}}{4\pi} \frac{2\sigma_0^2}{r_i} \end{aligned} \quad (\text{II.3.70})$$

$$\begin{aligned}
 \sigma_{a_n}^2 = & \sigma_{r_0}^2 \left(\frac{a_n}{R} \right)^2 + \sum_{i=1}^N \sigma_0^2 \left(\frac{1}{\pi R} \right)^2 \frac{\cos^2(n\theta_i)}{2} (\theta_{i+1} - \theta_{i-1})^2 \\
 & + \sum_{i=1}^N \frac{2\sigma_0^2}{r_i} \left(\frac{1}{\pi R} \right)^2 \left[-r_i n \sin(n\theta_i) \frac{\theta_{i+1} - \theta_{i-1}}{2} - (r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1}) - r_{i-1} \cos(n\theta_{i-1})) \frac{1}{2} \right]^2 \\
 & + 2 \sum_{i=1}^N \frac{\sigma_0^2}{4\pi} \left[\theta_{i+1} - \theta_{i-1} + \frac{r_{i-1} - r_{i+1}}{r_i} \right] \times \left(-\frac{a_n}{R} \right) \frac{1}{\pi R} \cos(n\theta_i) (\theta_{i+1} - \theta_{i-1}) \\
 & + 2 \sum_{i=1}^N \frac{\sigma_0^2}{4\pi r_i} \left[\theta_{i+1} - \theta_{i-1} + \frac{r_{i-1} - r_{i+1}}{r_i} \right] \times \left(-\frac{a_n}{R} \right) \frac{1}{\pi R} \left[-r_i n \sin(n\theta_i) \frac{\theta_{i+1} - \theta_{i-1}}{2} \right. \\
 & \left. - (r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1}) - r_{i-1} \cos(n\theta_{i-1})) \frac{1}{2} \right] + 2 \sum_{i=1}^N \frac{2\sigma_0^2}{r_i} \left(\frac{1}{\pi R} \right)^2 \frac{\cos(n\theta_i)}{2} (\theta_{i+1} - \theta_{i-1}) \\
 & \times \left[-r_i n \sin(n\theta_i) \frac{\theta_{i+1} - \theta_{i-1}}{2} \right. \\
 & \left. - (r_{i+1} \cos(n\theta_{i+1}) - r_{i-1} \cos(n\theta_{i-1})) \frac{1}{2} \right]
 \end{aligned} \tag{II.3.71}$$

On calcule de manière similaire σ_{b_n} ainsi que les covariances $\text{cov}(a_n, R)$, $\text{cov}(b_n, R)$ and $\text{cov}(a_n, b_n)$.

On passe enfin à la représentation en transformée de Fourier (voir § B.1.2 p. 112). Ayant $c_n^2 = a_n^2 + b_n^2$, ainsi que $q = n/\langle R \rangle$ et

$$\langle |u|^2 \rangle = (\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n| \rangle^2) \frac{\pi}{2} \langle R \rangle^3 \tag{II.3.72}$$

Prenant en compte la moyenne sur M contours qui est faite, on peut alors calculer les écarts type et covariances pour $\langle R \rangle$, $\langle c_n \rangle$ et $\langle c_n^2 \rangle$. Si j indexe le numéro du contour, alors

$$\sigma_{\langle |c_n|^2 \rangle}^2 = \frac{1}{M^2} \sum_{j=1}^M \sigma_{c_n^2}^2 \tag{II.3.73}$$

Ainsi que des équations similaires pour les autres déviations standards et les covariances. On trouve enfin pour le spectre de fluctuation :

$$\sigma_q^2 = \frac{\sigma_R^2 n^2}{\langle R \rangle^4} \tag{II.3.74}$$

$$\begin{aligned}
 \sigma_{\langle |u|^2 \rangle}^2 = & \left(\frac{\pi}{2} \langle R \rangle^3 \right)^2 \sigma_{\langle c_n^2 \rangle}^2 + \left(\frac{\pi}{2} \langle R \rangle^3 \right)^2 (2 \langle c_n \rangle)^2 \sigma_{\langle c_n \rangle}^2 \\
 & + (3 (\langle c_n^2 \rangle - \langle c_n \rangle^2) \pi / 2 \langle R \rangle^2)^2 \sigma_{\langle R \rangle}^2 - 4 \langle c_n \rangle \left(\frac{\pi}{2} \langle R \rangle^3 \right)^2 \text{cov}(\langle c_n^2 \rangle, \langle c_n \rangle) \\
 & + \langle R \rangle^3 (\langle c_n^2 \rangle - \langle c_n \rangle^2) \times \frac{3\pi^2}{2} \langle R \rangle^2 \text{cov}(\langle c_n^2 \rangle, \langle R \rangle) \\
 & - \langle c_n \rangle \pi^2 \langle R \rangle^3 3 (\langle c_n^2 \rangle - \langle c_n \rangle^2) \times \langle R \rangle^2 \text{cov}(\langle c_n \rangle, \langle R \rangle)
 \end{aligned} \tag{II.3.75}$$

Nous avons omis l'indice n du numéro du mode pour plus de clarté, néanmoins cela ne doit pas occulter le fait que les écarts-type comme les covariances en sont

dépendants. Nous avons utilisé ces différentes expressions pour calculer les barres d'erreurs sur l'amplitude des fluctuations (voir fig. II.39 p. 124) et sur les paramètres issus du fit (voir § A.3.2 p. 171).

C. Conclusion

L'analyse de contours nous permet de manière non invasive une mesure de paramètres physiques de vésicules géantes ; ces mesures seront développées dans la partie suivante. Cette analyse ne fait pas l'hypothèse que la forme de la vésicule est proche de la sphère, ce qui nous permet d'accéder à un plus large spectre de formes de vésicules. Les principaux avantages de la méthode que nous avons développée sont :

- l'acquisition en temps réel ce qui permet l'étude de phénomène avec une dynamique rapide comme nous le faisons au § B p. 198 ;
- par ailleurs le bruit est faible et permet d'accéder à une gamme de vecteurs d'onde plus large que les analyses préexistantes ;
- de plus, nous avons montré que notre analyse peut utiliser les expressions calculées pour les membranes planes, qui sont par exemple les seules disponibles à ce jour pour les membranes actives que nous étudierons au chapitre III.4 p. 181 ;
- enfin, un avantage majeur est l'accès direct au spectre, qui peut être comparé avec les expressions théoriques, fait nouveau par rapport aux techniques déjà existantes.

Une limitation de cette analyse à l'heure actuelle est qu'elle ne rend pas bien compte des petits modes ($n < 5$). Il faut néanmoins souligner la mise au point récente d'une analyse à l'aide de modélisation numérique pour ces premiers modes [Döbereiner et al., 2003]. L'autre limite dans le domaine des grands vecteurs d'onde est due au temps d'intégration de la caméra d'une part et aux autres phénomènes qui viennent masquer le spectre aux petites longueurs d'onde et que j'ai décrits dans ce chapitre.

Nous avons déjà bien diminué le bruit de détection par rapport à de nombreux montages disponibles. Cependant les limites techniques basées sur la vidéomicroscopie sont atteintes. D'autres techniques comme la diffusion de lumière sur une vésicule unique doivent être développées pour aller plus loin.

Troisième partie

Mesures

Chapitre III.1

Dispositif Expérimental



DANS CE CHAPITRE, nous allons détailler le système expérimental que nous avons utilisé, son obtention et sa caractérisation. Nous nous restreindrons pour le moment au cas des vésicules purement lipidiques et ainsi qu'aux techniques générales à toutes nos expériences, pour aller au chapitre suivant vers les techniques spécifiques aux protéoliposomes, notamment avec la bactériorhodopsine.

A. Fabrication des liposomes géants

Les liposomes géants sont obtenus par électroformations à partir d'un dépôt de lipides selon la technique mise au point par M. Angelova [Angelova and Dimitrov, 1987; Angelova et al., 1992b; Angelova et al., 1992a] et modifiée par L. Mathivet [Mathivet et al., 1996]. Les détails de cette technique vont être l'objet des paragraphes suivants. Néanmoins on peut retenir que cette méthode impose de fabriquer les liposomes dans des milieux faiblement salins. L'alternative est la pousse dite «spontanée» des liposomes géants qui consiste à pratiquer le même type de dépôt sur une plaque de téflon rugueuse et à laisser les liposomes se former spontanément à 37°C. Dans ce cas, les liposomes obtenus sont beaucoup moins monodisperses en taille et surtout comportent une proportion extrêmement importante de liposomes multilamellaires et de topologie élevée. On peut encore mentionner l'extension récente de cette dernière méthode à des milieux fortement salins [Yamashita et al., 2002].

Afin de tester notre algorithme de reconnaissance de contours ainsi que l'analyse que nous faisons des résultats, nous avons fabriqué des vésicules purement lipidiques.

A.1 Préparation des solutions

A.1.1 Solution Stock

Le plus simple consiste à mettre les lipides en poudre (Avanti Polar Lipids) en solution dans du Chloroforme (CHCl_3) (Sigma-Aldrich) ; on prépare des solutions stock d'EPC, de SOPC et de SOPC:CHOL (1:1 mol/mol), en mélangeant le lipide acheté en poudre en petite quantité (25 mg), avec du chloroforme, afin d'obtenir une solution à 10 mg/ml. Afin de garder la poudre et les solutions exemptes d'eau, plusieurs précaution doivent être prises ; en effet la présence d'eau induit l'hydrolyse lente des lipides en lysolipides et modifie par là même les propriétés physiques des membranes. Pour cela, la poudre est livrée en ampoule scellée et conservée ainsi à -80°C . Avant d'ouvrir l'ampoule, sa température est ramenée à la température ambiante afin d'éviter la condensation d'eau à l'intérieur de l'ampoule. Dès que l'ampoule est ouverte, l'ensemble de la poudre contenue est solubilisée dans le chloroforme ; le chloroforme utilisé provient directement du flacon d'origine. Le pipetage est fait à l'aide de microseringues (Hamilton) en verre et métal (la plupart des polymères étant solubles ou gonflant dans le chloroforme) convenablement rincées au chloroforme. Ces solutions stock sont conservées sous argon, au congélateur à -20°C , pour une durée d'au plus deux mois, dans des flacons en verre et septum de téflon.

A.1.2 Solution courante

Afin d'éviter de nombreux cycles de décongélation/ouverture/congélation qui favorisent la condensation d'eau et nuisent à la conservation des lipides, à partir de ces solutions stock sont fabriquées des solutions d'usage courant à une concentration de 0.5 mg/ml dans du chloroforme à partir de la solution stock. Les mêmes précautions lors de la décongélation, du pipetage, du choix des flacons et des bouchons, et de la congélation sont prises. Ces solutions sont utilisées pendant quelques semaines tout au plus, ce qui correspond à typiquement 5 cycles décongélation/recongélation.

A.2 Fabrication du dépôt sur la lame de pousse

A.2.1 Dépôt

Avec une microseringue, on dépose typiquement $10\ \mu\text{l}$ de solution à 0.5 mg/ml sur chaque lame de pousse. Ce dépôt se fait en chambre froide (en ayant pris soin de laisser thermaliser au préalable la solution et l'ensemble des instruments) afin de diminuer la vitesse d'évaporation du chloroforme et de permettre un dépôt plus homogène. Le dépôt est fait en traçant des cercles sur la lame de pousse tout en injectant progressivement la solution. Ainsi on étale au maximum la zone d'évaporation et on obtient un film lipidique qui paraît irisé lorsqu'on fait réfléchir la lumière sur la lame de pousse.

A.2.2 Séchage

Une partie du séchage se fait au fur et à mesure du dépôt, néanmoins une évaporation plus poussée du solvant est nécessaire afin de permettre un bon gonflement des vésicules. Pour cela, les lames sont placées dans une enceinte à vide pendant au moins plusieurs heures et au mieux une nuit. La pression doit être au plus de quelques dizaines de Pascal (quelques centaines de mTorr).

A.3 Electroformation des GUVs

Ce dépôt est fait sur une lame de verre recouverte d'*Indium Tin Oxide* (ITO) qui lui permet d'être à la fois transparente et conductrice. La chambre formée par deux lames de verre réunies ensemble par de la pâte à sceller (Vitrex, Danemark), avec une épaisseur interne de 1 mm fixée par deux espaceurs en téflon ; deux fines bandes de cuivre adhésif (Radiospare) placées au sommet des espaceurs permettent de faire contact sur les lames d'ITO et de les relier à un générateur basse fréquence (voir fig. III.1).

La cellule est alors remplie avec une solution qui sera celle constituant l'intérieur des

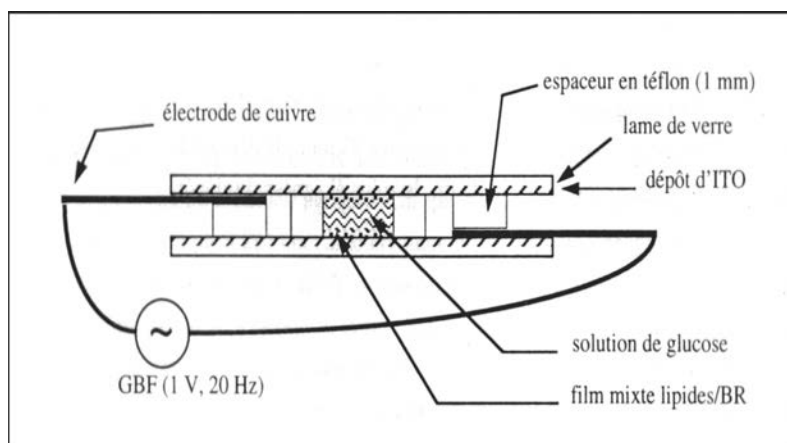


FIG. III.1 – Représentation schématique d'une cellule d'électroformation (d'après [Manneville, 1999]).

GUVs. Dans notre cas, la solution contient généralement du sucrose à 50 mM ; elle sera précisée dans chaque expérience. Notons toutefois qu'il est important que la solution de contienne pas trop d'ions sinon cela empêche la formation des vésicules. Par ailleurs, lors des premières expériences que nous avons menées, de l'azide de sodium (qui évite le développement des bactéries) était ajouté (à 1 mM) ; néanmoins nous n'avons pas poursuivi car l'azide peut perturber l'activité de la bactériorhodopsine [Radionov and Kaulen, 1996] d'une part, et empêche la pousse à des concentrations trop importantes (typiquement 10 mM) [Roux, 2003]. En conséquence, les solutions que nous avons utilisées ont toujours été filtrées au moment de la préparation des GUVs avec un filtre à $0.2\ \mu\text{m}$ afin d'éviter la présence de bactérie.

Pour faire pousser les vésicules, une tension alternative de forme sinusoïdale est

appliquée dès que l'injection du sucrose a eu lieu ; sa fréquence est typiquement 20 Hz dans le cas d'EPC, et 15 Hz pour SOPC, pour atteindre 10 Hz dans le cas de SOPC-Chol ; en effet, plus la rigidité de courbure de la membrane est grande, plus il convient de diminuer la fréquence. La tension est augmentée depuis 20 mV jusqu'à 1.1 V en 8 paliers (60 mV, 100 mV, 200 mV, 300 mV, 500 mV, 700 mV, 900 mV) durant 3 à 4 min 40 s, puis reste constante à la valeur maximale. L'ensemble dure typiquement 5 h. Enfin une tension carrée d'amplitude 1.5 V est appliquée pendant 30 min à 1 h pour décoller les vésicules de la surface et entre elles. On pourra trouver une image des vésicules au cours de de l'électroformation fig. III.2.

Notons que les vésicules issues de l'électroformation sont relativement tendues et qu'il est mieux d'attendre une journée avant de les utiliser afin que cette tension diminue et permette une observation plus facile des fluctuations. Une autre solution est de faire pousser les vésicules au réfrigérateur pour ensuite les observer à température ambiante ; cette élévation de température rend les vésicules plus fluctuante ; en effet le coefficient de dilatation thermique des membranes étant plus élevé que celui de la solution, l'élévation de température rend les vésicules plus fluctuantes (néanmoins, on ne peut pas non plus augmenter trop la température sinon des phénomènes comme l'hydrolyse des diacyl-PC vers des lyso-PC peut avoir lieu et perturber les mesures). Il est aussi à remarquer que les vésicules de SOPC ne doivent en aucun cas être mises au réfrigérateur puisque la température de transition de ce lipide est 6 °C. En effet pour pousser les lipides des vésicules doivent être en phase fluide. On ne peut pas non plus les placer à 4 °C après la pousse, car une transition de phase va complètement détruire la plupart des vésicules, ne laissant que des spécimen relativement sales (multilamellaires, avec des tubes de lipides accrochées à la membranes, des amas de lipides sur la membrane qui apparaissent sous forme de points noirs).

Les vésicules sont conservées au réfrigérateur pendant au plus quelques jours (toujours à cause de l'hydrolyse des lipides qui forme des lysolipides), sauf pour le cas de SOPC comme expliqué ci-dessus.

B. Système expérimental

La partie optique du montage expérimental a été décrite en détail au § A.1.1 p. 78. Nous ne la redécrivons donc pas ici. Nous allons dans un premier temps nous intéresser à la cellule d'observation.

B.1 Cellule d'observation

Notre système a évolué au cours des expériences, nous n'en donnerons que les versions qui ont été utilisées pour faire les dernières mesures. Nous avons fait une bonne part des mesures sur les vésicules passives dans le système initial décrit dans l'annexe 1 p. 217, alors que les dernières mesures de vésicules passives et l'ensemble des mesures sur les membranes actives se sont faites dans la configuration simplifiée que nous allons décrire.

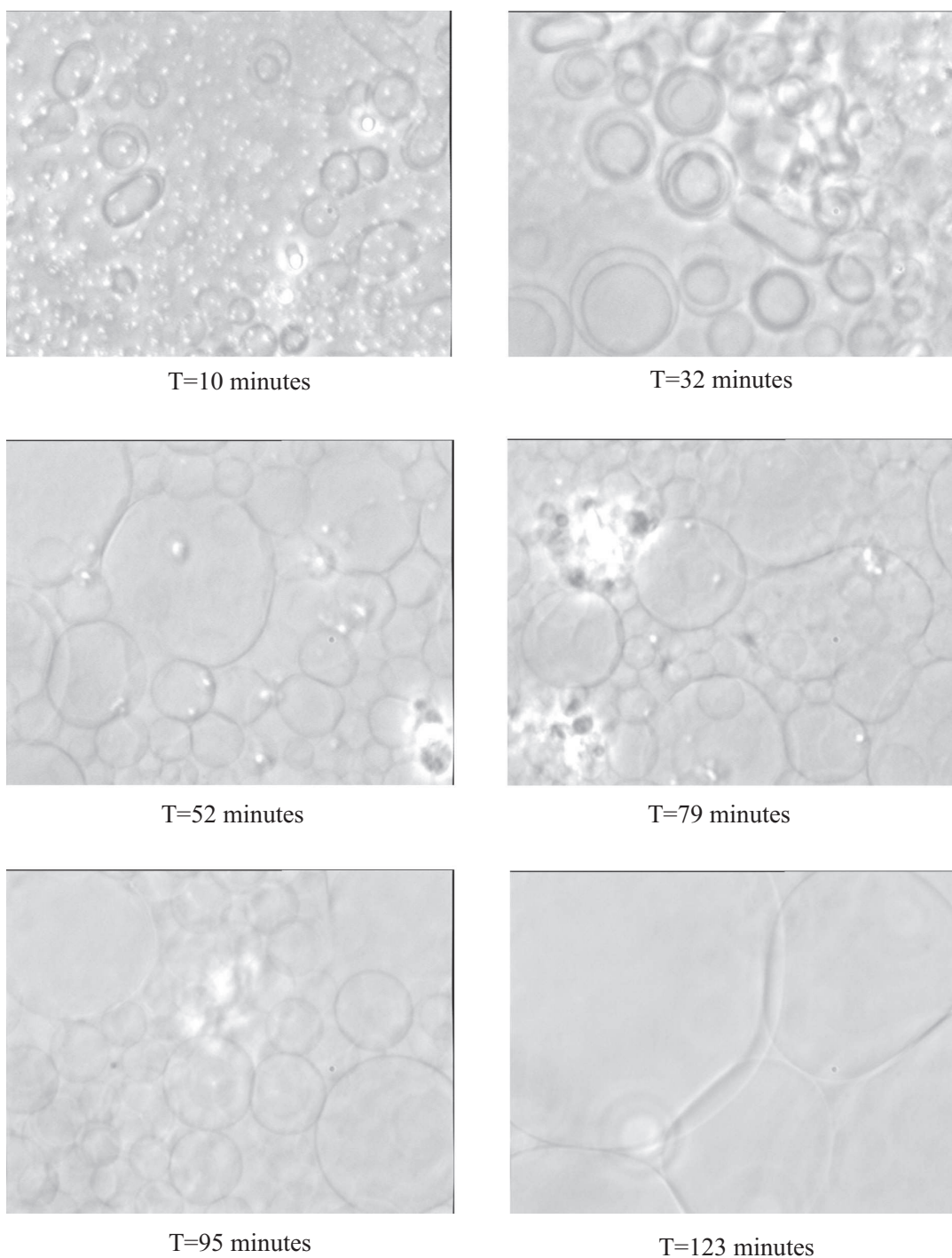


FIG. III.2 – *Image d'une préparation de vésicules d'EPC au cours de l'électroformation*

Elle comporte deux lamelles de verres collées ensemble avec du parafilm que l'on fait fondre. Cela garantit une chambre inerte vis-à-vis des vésicules. La chambre est fermée sur trois coté et peut être fermée du quatrième coté afin d'éviter l'évaporation, avec de la pâte à sceller ou du l'huile minérale utilisée en électrophorèse. Ces produits sont eux aussi inertes. L'épaisseur de la chambre entre les lames est de $600\text{ }\mu\text{m}$ environ pour permettre le passage d'une «pipette cargo» utilisée pour le transfert des vésicules, et de 1 mm à l'extérieur pour satisfaire au faible espace séparant le condenseur et l'objectif lorsqu'il sont conjugués.

B.2 Protocole de fabrication et de remplissage de la cellule d'observation

B.2.1 Traitement au PEG

Afin d'éviter l'adhésion des vésicules sur la lamelle de verre inférieure des chambres, celle-ci est recouverte d'un polymère hydrophile, le PolyEthylène Glycol (PEG ou PEO) greffé de manière covalente sur la lame de verre. Le protocole mis au point par P. Nassoy est le suivant [Nassoy, 2000]. Les manipulations sont à faire de préférence sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute poussière qui viendraient se coller à la lame. On nettoie les lamelle à l'aide d'un mélange de 70 % d'acide sulfurique et 30 % de peroxyde d'hydrogène (Mélange «piranha»). Ce mélange très oxydant permet par ailleurs d'«activer» les silanols de surface de la lamelle de verre, favorisant ainsi la silanisation. Les lamelles sont rincées trois fois à l'eau distillée, puis deux fois au méthanol et sont ensuite laissées une nuit dans un mélange de 43 ml de méthanol, 2 ml d'eau distillée, 400 μl d'acide acétique et 1 ml de 3-MercaptoPropylTriméthoxySilane à 97 % (ABCR) (voir fig. III.3). La quantité correspond au volume nécessaire pour silaniser dix lames de $22 \times 22\text{ mm}$ placées sur un support en téflon.

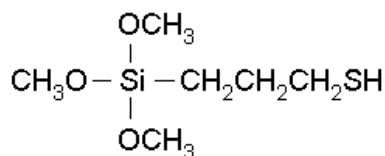
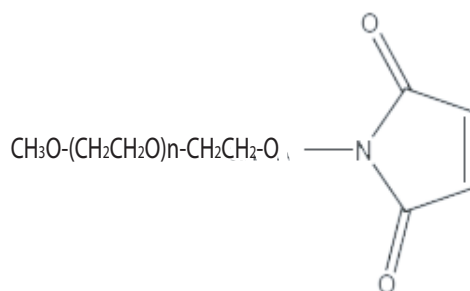


FIG. III.3 – *Formule chimique du 3-MercaptoPropylTriméthoxySilane*

Les lamelles sont ensuite rincées à nouveau au méthanol, séchées sous flux d'azote et mises 10 min au four à 120°C . Une fois refroidies, elles sont placée dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) à $\text{pH} = 7.5$, avec 0.14 mg de Mal-PEG (méthoxyPolyEthylène Glycol - Maléimide, Masse Moléculaire 5000) (voir fig. III.4) par cm^2 de verre à traiter en veillant à diluer le moins possible pour éviter l'hydrolyse du Mal-PEG. La fonction maléimide réagit sur la fonction mercapto du silane déjà greffé.

FIG. III.4 – *Formule chimique du Mal-PEG*

On laisse réagir quelques heures à température ambiante puis on rince à l'eau distillée et on sèche sous flux d'azote. Les lames sont alors conservées dans une enceinte à vide en attendant d'être utilisées. Nous avons vérifié par RICM (voir [Rädler et al., 1995]) que les vésicules n'adhèrent pas sur des lames préparées par ce procédé.

B.2.2 Transfert des vésicules

Les vésicules doivent être transférées de la chambre où a eu lieu l'électroformation vers celle où les observations vont se faire en minimisant les cisaillements d'autant plus que la vésicule se trouve fragilisée car on la transfère dans un milieu légèrement hyperosmotique. Pour cela, à l'aide d'un dispositif de micromanipulation pour micro-pipettes, nous aspirons doucement des vésicules, à l'aide d'une différence de pression de quelques centaines de Pascal dans un capillaire d'environ $400\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre intérieur (Vitrocom), préalablement rempli de la même solution que celle où les vésicules ont poussé (sucrose 50 mM avec un tampon et des sels éventuels selon si on travaille sur des vésicules purement lipidiques ou contenant des protéines). Puis on sort doucement la pipette de la chambre de formation et on l'introduit dans la cellule d'observation où on expulse les vésicules dans la solution de glucose (typiquement glucose 54 mM, concentration que l'on peut faire varier en fonction de l'addition de tampon et de sels éventuels, ainsi que de la différence de pression osmotique désirée) à l'aide d'une légère surpression. Cette solution légèrement hyperosmotique permet de rendre les vésicules plus fluctuantes.

B.2.3 Observation et choix de la vésicule

La vésicule dont on veut effectuer l'étude est choisie loin de toute autre vésicule ou poussière qui pourrait perturber la reconnaissance de contours et ainsi la mesure du spectre de fluctuation. Par ailleurs, on évite les vésicules présentant des défauts visibles optiquement (tubes, petits bourgeons (*microbudding*),...); néanmoins il reste potentiellement des défauts à une échelle suboptique [Boroske and Elwenspoek, 1981; Häckl et al., 1997].

Chapitre III.2

Un modèle de vésicule active



UNE DES APPLICATIONS intéressantes de notre algorithme de reconnaissance de contours est l'étude des membranes «actives». Nous nous sommes orientés vers des vésicules contenant la bactériorhodopsine (BR), une pompe à protons photoactivable, car l'effet de l'activité sur les fluctuations avait déjà été montré [Manneville et al., 2001]. Néanmoins notre technique pouvait donner des mesures supplémentaires des paramètres physiques. Pour cela nous avons mis au point une nouvelle méthode permettant l'obtention de manière plus contrôlée que dans les expériences précédentes de GUVs contenant la protéine et effectué les tests pour valider ce protocole.

La bactériorhodopsine est une pompe à proton photoactivable qui est capable de transporter des protons contre un gradient de concentration en utilisant l'énergie lumineuse. Cela nous a permis d'observer sur une même vésicule les cas actif et passif, en changeant simplement un filtre sur le dispositif d'éclairement de la préparation (voir fig. III.5). La mise en œuvre expérimentale est beaucoup plus simple qu'avec des protéines où l'énergie provient d'un gradient d'ions (comme un gradient de protons pour les ATP-synthétases) ou l'hydrolyse de l'ATP comme pour la grande famille des ATPases.

A. La bactériorhodopsine, origine et structure

On trouvera une revue récente sur la structure, les relations structure-fonction, et le cycle de la BR dans [Haupts et al., 1999].

A.1 Origine de la Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine exprimée à la surface d'une archéobactérie, *Halobacterium Salinarium* (appelée aussi *Halobacterium Halobium*), et concentrée lorsque le milieu manque d'oxygène (condition anaérobie). Elle forme des arrangements cristallins, bidimensionnels hexagonaux, dans une structure appelée « membrane pourpre » situés principalement dans la couche externe de la bactérie. Cette protéine est constituée de 7 hélices alpha transmembranaires qui forment une cage

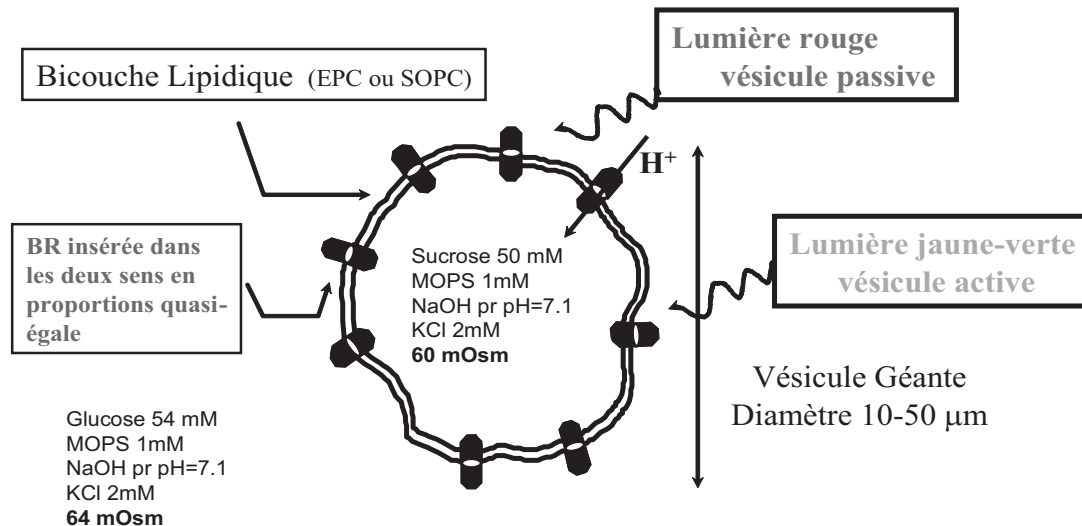


FIG. III.5 – *Schema du modèle expérimental. La BR est reconstituée dans des vésicules géantes (SOPC ou EPC). Sur la même vésicule, l'éclairage rouge la met dans un état passif, et l'éclairage en jaune dans un état actif.*

contenant une molécule de rétinale [Ehrenberg and Meiri, 1983]. Cette molécule, dans ces conditions, a la propriété d'absorber la lumière avec un maximum à 568 nm, donc dans la région jaune-vert du spectre visible, ce qui lui confère une couleur violette; ceci lui permet de pomper des protons du cytoplasme de la bactérie vers le milieu extracellulaire (voir fig. III.6). Cette bactérie vit dans les milieux fortement salins (concentration typique en sel, 4 M)^a [Madigan et al., 1997]. Le gradient de protons formé par cette protéine permet à la bactérie de synthétiser de l'ATP, donc de l'énergie directement utilisable, via une ATP-synthétase, qui utilise le passage des protons dans le sens du gradient comme source d'énergie pour fabriquer de l'ATP. La BR est associée dans la bactérie à trois autres protéines basées sur le rétinale: l'halorhodopsine (HR) capable de pomper des ions Chlore Cl⁻ du cytoplasme vers le milieu extracellulaire afin de rétablir l'électroneutralité et d'empêcher la formation d'un potentiel transmembranaire, qui ralentirait, voire stopperait l'activité de la BR; deux autres protéines lui sont associées, les SensoryRhodopsine I et II (SRI et SRII) qui permettent à la bactérie de se déplacer, grâce à ses flagelles, vers des régions où l'éclairage est le plus favorable à l'activité de la BR^b [Haupts et al., 1999].

A.2 Structure

La BR est une protéine membranaire, de masse molaire 26 kDa et dont la séquence comporte 248 acide aminés, organisés en 7 hélices alpha, comme on le voit

a. On peut noter que la couleur rose-violacée des marais salants ou des lacs hyper-salins est due à cette bactérie qui se développe à leur surface.

b. et d'éviter les zones éclairées en bleu (longueur d'onde qui comme on le verra dans la suite inhibe le cycle de pompage de la BR).

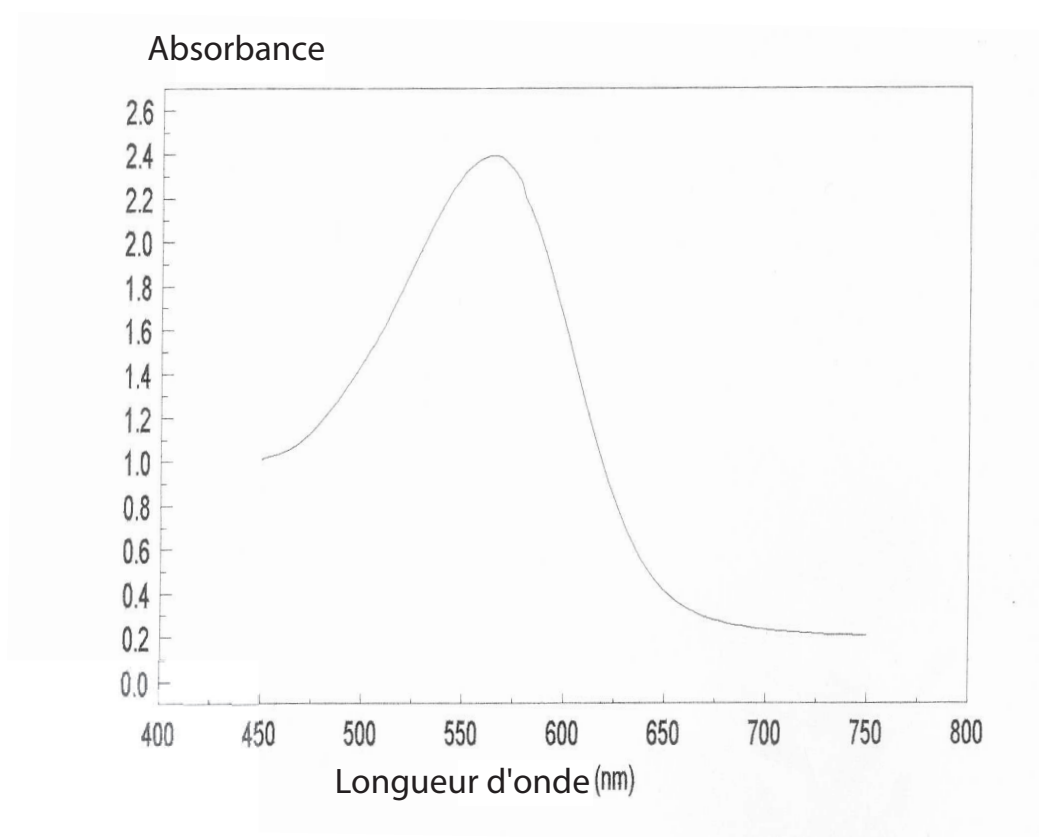


FIG. III.6 – *Spectre d'absorption de la BR. On note un maximum d'absorption à 568 nm.*

fig. III.7. La BR grâce à sa structure cristalline dans son milieu naturel a été une

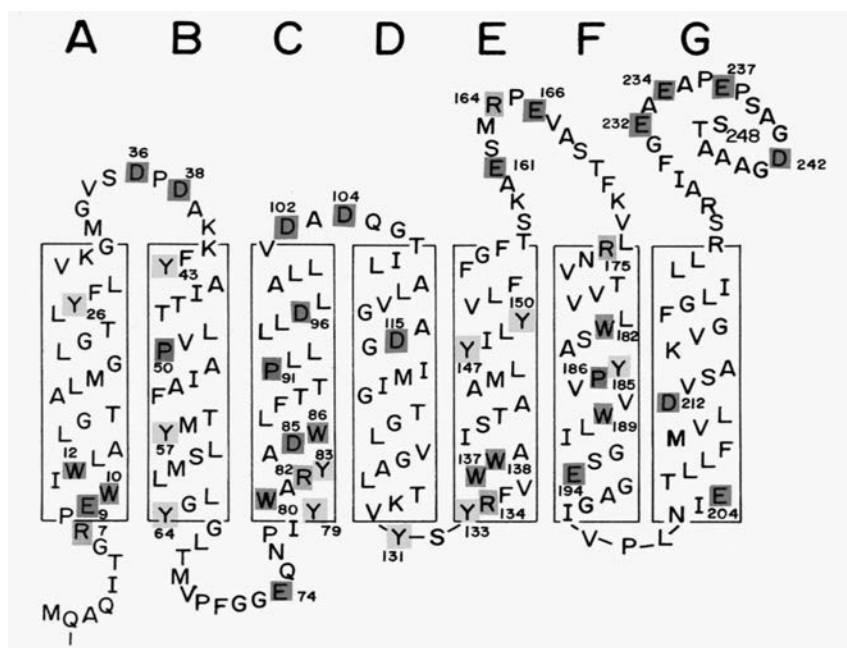


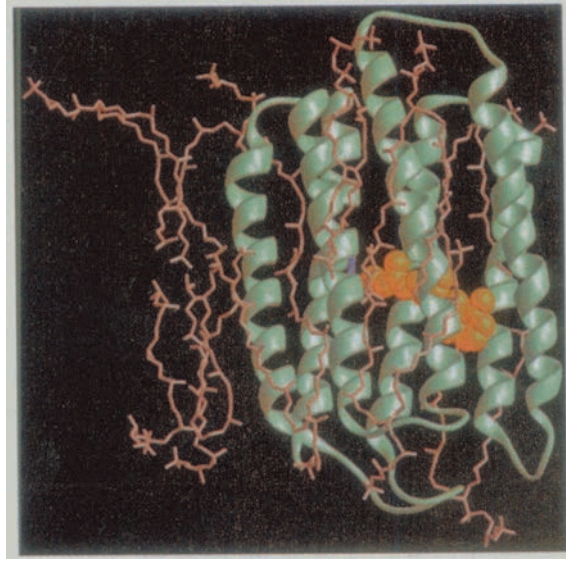
FIG. III.7 – Structure primaire de la BR. Les acides aminés sur fond grisé et numérotés sont ceux qui ont un rôle particulier et ont donné lieu à une étude par mutation génétique. On notera les 7 hélices alpha dénommées par les lettres A à G. Sur la figure, le haut représente le coté cytoplasmique de la protéine et le bas le coté extracellulaire (d'après [Khorana, 1988]).

des premières protéines membranaires dont la structure a été déterminée grâce aux techniques de rayons X et aux techniques de microscopie électronique (pour une revue sur les résultats récents sur la structure de BR, voir [Subramaniam, 1999]). C'est aussi la première dont on a déterminé la structure des intermédiaires conformationnels. Un consensus se dégage sur la structure tridimensionnelle générale de la protéine (voir fig. III.8) [Subramaniam, 1999] bien que des points particuliers restent en débat, notamment l'association avec des molécules d'eau présente dans des poches hydrophiles de la protéine (permettant une interaction avec le proton [Lanyi, 1997]), et la présence de cations dans la protéine.

Par ailleurs, le repliement de la protéine pour atteindre sa forme active est aussi l'objet de recherche intense [Haupts et al., 1999]^c.

La BR interagit aussi avec les lipides de la membrane. Dans la « membrane pourpre », il y a environ 10 lipides par BR qui interagissent avec la protéine au niveau des parties hydrophobes des hélices alpha. Les acides aminés impliqués dans

c. Par des expériences de dénaturation, renaturation à l'aide de détergent (SDS par exemple), on observe les divers intermédiaires jusqu'à la bactério-opsin (BO), une protéine de même séquence que la BR mais ne contenant pas de rétinol, dans diverses conformation jusqu'à la BR. Il se dégage que le rétinol, tout comme les ions du milieu très salin, joue un rôle important pour orienter le repliement de la protéine [Haupts et al., 1999].



à

FIG. III.8 – *Structure tertiaire de la BR. Les hélices alpha sont représentées en vert et le rétinale en orange.*

ces interactions restent un point en discussion. Ces lipides ont deux queues aliphatiques hydrophytanoyl avec des têtes PhosphatidylGlycérolPhosphate (PGP), PhosphatidylGlycerol Phosphate Methylester (PGP-Me), PhosphatidylGlycérol Sulfate (PGS) et un lipide triglycoside sulfate (S-TGA-1). Ces lipides par leurs interactions entre leurs queues et les parties membranaires hydrophobes de la protéine stabilisent la conformation de la protéine. Par ailleurs, les boucles de la protéine du côté du cytoplasme, conjointement avec les têtes polaires des lipides permettent une capture du proton pour l'amener dans la partie cytoplasmique du canal de la protéine (voir fig. III.12 p. 149).

Enfin, donnons ici quelques caractéristiques physiques de la BR. La BR ne dépasse quasiment pas de la bicouche lipidique et occupe un disque de surface $S_{BR} \simeq 8.75 \text{ nm}^2$ soit un rayon de $R_{BR} \simeq 1.7 \text{ nm}$; en trois dimensions elle est sensiblement cylindrique avec une hauteur de 5 nm [Alberts et al., 1989, p. 293]. Elle a une densité de charge sensiblement équivalente à deux charges négatives à $pH = 7$ [Ebrey, 1993].

B. Fonctionnement de la BR

B.1 Relation structure-fonction

En ce qui concerne les relations structure fonction, la protéine forme un canal avec une base de Schiff. Au milieu se trouve le rétinale qui est lié à la protéine par le résidu lysine 216. En fonction de l'absorption du photon, l'isomérisation du rétinale modifie l'affinité du proton pour la base de Schiff, ainsi que son orientation du

côté cytoplasmique, ou du côté extracellulaire. Ce canal comporte une série d'acides aminés pouvant être protonés pour conduire le proton jusqu'à la base de Schiff et depuis la base de Schiff jusqu'au milieu extramembranaire (voir fig. III.12 p. 149). Lors de cette sortie il apparaît que le proton diffuserait plus rapidement en surface de la membrane sur les boucles côté extracellulaire de la protéine, ainsi que sur les têtes des lipides, que directement dans l'eau (Sur les modifications du potentiel de surface de la protéine, voir [Heberle and Dencher, 1992]).

B.2 Cycle de fonctionnement

La durée typique du cycle de fonctionnement est 10 ms. La protéine afin de pomper un proton va passer par plusieurs états intermédiaires qui ont été caractérisés à l'aide de mutants bloqués dans ces états [Subramaniam et al., 1999; Subramaniam and Henderson, 2000]. Le schéma fig. III.9 p. 146 reproduit le cycle qui fait le consensus à l'heure actuelle et la fig. III.10 p. 147 les configurations du rétinale lors de ce cycle.

Nous allons maintenant donner à partir du schéma du cycle fig. III.9 p. 146 quelques explications. Il faut noter que toutes les transitions (sauf mention contraire) sont des équilibres déplacés vers l'état final grâce au changement de conformation du rétinale et de la protéine. Si la BR est maintenue dans l'obscurité une demi-heure à une heure, elle va être dans la conformation *dark-adapted*. Le rétinale est alors distribué dans des rapports équimolaires entre la forme 13-cis et la forme all-trans (voir fig III.10 p. 147). Le maximum d'absorption est situé vers 548 nm (état D_{548}). Le rétinale contient une base de Schiff qui va être protonée ou déprotonée en fonction des conformations de la molécule. Lors de l'exposition à la lumière, en quelques minutes tout l'isomère 13-cis est transformé en isomère actif all-trans [Kouyama et al., 1985]. C'est dans cette conformation que la BR a le spectre indiqué fig. III.6 p. 141. On va parler de l'état *light-adapted* (état B_{568}).

Les premières étapes du cycle commencent par l'absorption d'un photon dans la bonne gamme de longueur d'onde qui va amener dans l'état excité la région de Franck-Condon. Avec une efficacité quantique de 0.64, le rétinale va passer dans sa conformation 13-cis, et après un certain nombre d'intermédiaires (J, K, KL, L) encore activement étudiés [Polland et al., 1986] la base de Schiff va céder son proton au résidu Asp85^d. On passe maintenant vers l'état M puis vers les états M_1 , puis M_2 , transition au cours de laquelle la conformation va changer de sorte que la base de Schiff qui était orientée du côté extracellulaire du canal formé par les hélices alpha, va se retrouver du côté cytoplasmique. Le canal s'élargit de ce côté et il y a basculement des hélices F et G (voir fig. III.11 p. 148) pour permettre l'accès d'un proton du côté cytoplasmique [Subramaniam and Henderson, 2000]. La base de Schiff est alors prête à interagir avec le résidu Asp96 (Il existe deux états M en équilibre, qui diffèrent par l'accessibilité de la base de Schiff depuis le côté extracellulaire [Radionov

d. D'autres interactions entre aussi en jeu (liaison hydrogène avec Asp212 par exemple) et une action encore controversée des molécules d'eau faisant partie de la structure de la protéine.

and Kaulen, 1996]^e.

L'étape de passage de M_1 vers M_2 est irréversible, sauf si la BR est éclairé en lumière bleue (maximum d'absorption 410 nm) ce qui la ramène vers l'état M, garde la base de Schiff du côté extracellulaire, et conduit à la réabsorption d'un proton de ce côté, qui ramène la protéine dans l'état B. Cette voie correspond donc à l'absence de pompage net [Shrager et al., 1995]^f. A cette étape Glu194 et Glu204 vont relâcher le proton qu'ils fixaient du côté extracellulaire. Nous passons ensuite à l'état M_N par pivotement de l'hélice B, puis vers l'état N, où le résidu Asp96 transfère un proton vers la base de Schiff qui est donc à nouveau reprotonée; un proton diffuse alors à partir du côté cytoplasmique pour reprotoner Asp96. On passe ensuite à l'état O avec le changement de conformation du rétinal pour revenir vers la forme all-trans, puis le cycle se clôt par la relâche du proton par Asp85 vers les résidus la sortie du canal côté extracellulaire Glu194 et Glu204 [Luecke et al., 1999], [Heberle and Dencher, 1992]. La protéine revient alors à son état initial B [Haupts et al., 1999].

Le cycle total correspond bien au transfert d'un proton du côté cytoplasmique vers le milieu extracellulaire. On pourra trouver une illustration du trajet du proton fig. III.12 p. 149 ainsi que des détails sur le trajet du proton dans [Luecke et al., 1999]. Enfin notons l'amplitude, 3.5 Å, du mouvement de pivotement de l'hélice F qui accompagne le pompage du proton. On remarquera qu'en ce qui concerne le temps de parcours du cycle ce sont les étapes de transition de M vers N et de O vers B qui sont limitantes puisqu'elles durent quelques millisecondes.

C. Dépendance avec le milieu environnant

La BR fonctionne à l'état naturel dans un milieu hautement salin et dont le pH reste proche de $pH = 7.1$. Sur des LUVs dont la membrane contient la Bactériorhodopsine et obtenues par la méthode de reconstitution décrite § E.2 p. 156, des expériences ont été réalisées par P. Girard au laboratoire afin de déterminer la concentration minimale en tampon et en sel permettant le fonctionnement de la BR [Girard et al., 2004b]. Dans ces liposomes, la protéine est majoritairement orientée et pompe les protons vers l'intérieur. Ces tests ont été effectués en ajoutant à une solution concentrée de LUVs, de la 9-AminoAcridine (9-AA) [Cladera et al., 1996] (voir fig. III.13 p. 150), une sonde fluorescente sensible au pH dont la fluorescence décroît lorsque le pH augmente.

On obtient ainsi une quantification du pH dans le milieu extérieur qui varie avec le pompage de la BR. La mesure de la pente au début du pompage nous renseigne sur l'efficacité du pompage dans le milieu étudié (voir fig. III.14 p. 150).

En effet lorsque la différence de potentiel électrochimique augmente en valeur absolue entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules, l'efficacité de pompage de la BR

e. Ces états ont été étudiés aussi à l'aide de mutants (comme par exemple dans [Radionov et al., 1996]).

f. Il existe d'autres voies qui conduisent à des cycles non pompant, mais nous ne les détaillerons pas ici, sachant qu'elles sont encore l'objet de recherches.

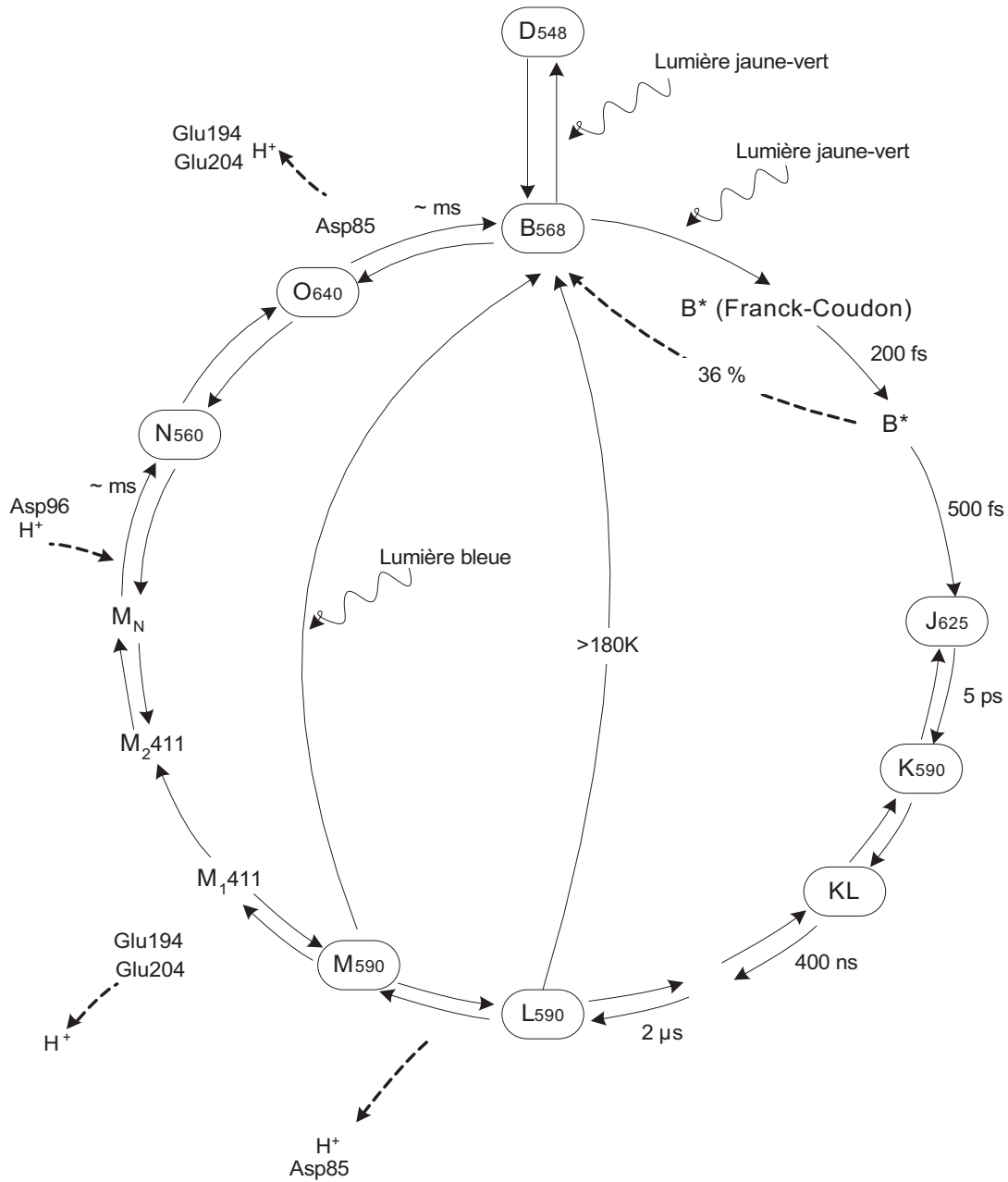


FIG. III.9 – Représentation du cycle de la BR indiquant les différents intermédiaires et les temps de transition. On indique aussi la longueur d'onde du maximum d'absorption en petits caractères à la suite du nom. En pointillés sont indiqués les modifications sur les acides aminés proches de la base de Schiff ainsi que les branchements dans le cycle qui conduisent à des cycles non pompants (d'après [Haupts et al., 1999; Oesterhelt and Tittor, 1989; Birge, 1990; Luecke et al., 1999]).

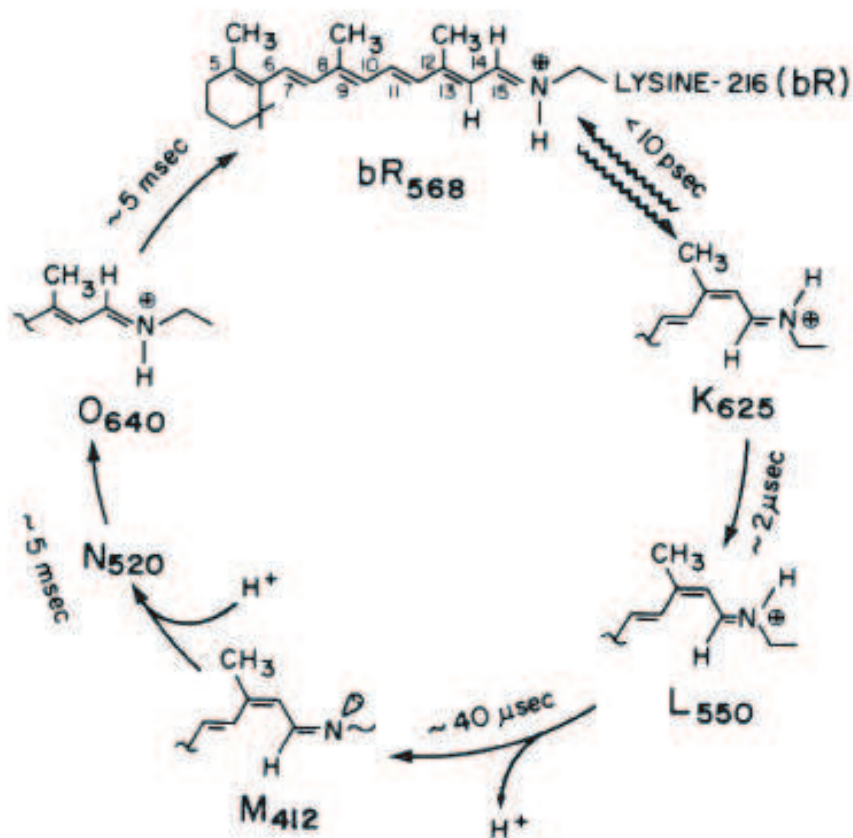


FIG. III.10 – Modèle courant du cycle du rétinale lors du cycle de la BR (voir fig. III.9). Seule la première étape nécessite l'éclairage (symbolisé par la flèche ondulée). On remarque la base de Schiff (protonée ou non selon la position dans le cycle), et le changement de conformation de all-trans / 13-cis du rétinale. Le nombre en indice indique le maximum d'absorption du rétinale dans chaque conformation, lorsqu'il se trouve dans la BR (d'après [Khorana, 1988]).

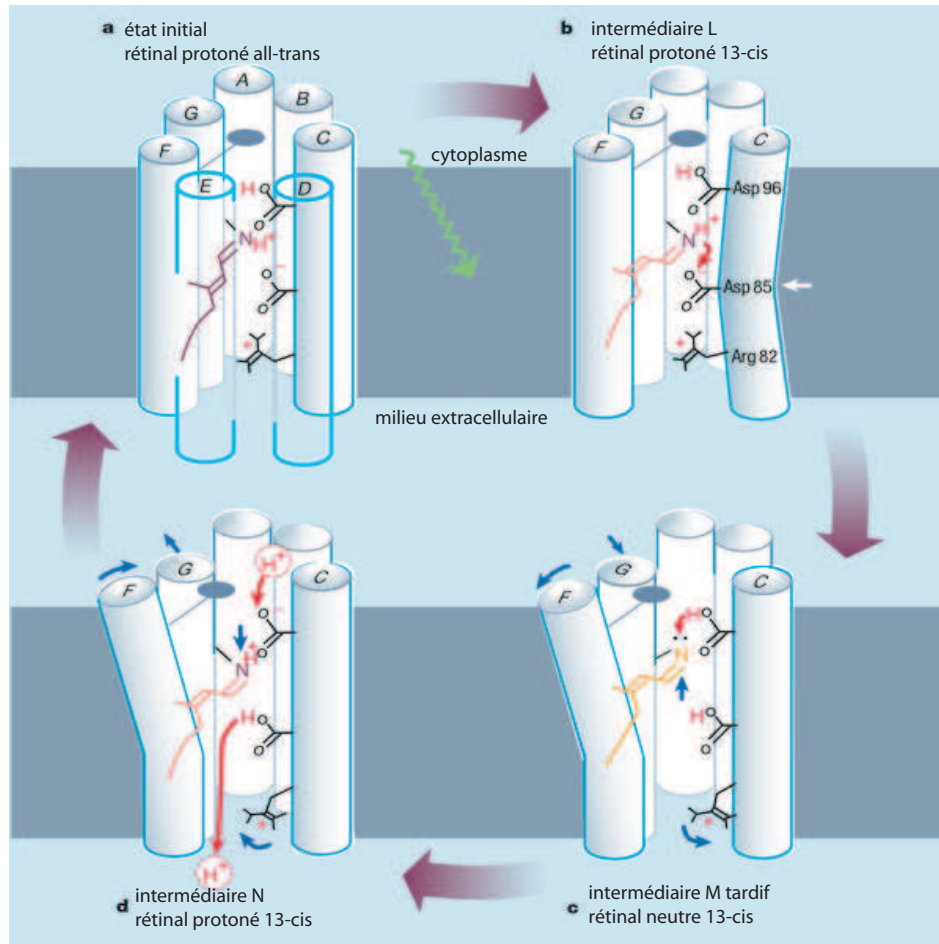


FIG. III.11 – Schéma des mécanismes moléculaires de pompage de la BR. Le rétinal est dans l'espace entre les hélices alpha (A-G), lié par une lysine de l'hélice G. (a) Etat initial (b) La lumière provoque l'isomérisation du rétinal de la conformation all-trans (en violet) vers la conformation 13-cis (en rose) et déclenche le transfert du proton vers Asp85, aidé par un léger mouvement de ce résidu dans la configuration L. (c) Dans l'état M, les résidus en sortie du canal Glu194 et Glu204 relâchent un proton dans le milieu extracellulaire ; puis le rétinal déprotoné (en jaune) se redresse et l'hélice F s'incline. Cela ouvre le canal du côté intracellulaire et permet la reprotonation du rétinal par Asp96. (d) Le résidu Asp96 est ensuite reprotoné par transfert de proton à partir du côté cytoplasmique. Asp85 transfère son proton aux résidus en sortie du canal Glu194 et Glu204 à travers un réseau de liaisons hydrogène et de molécules d'eau, en passant par Arg82 qui bouge légèrement pour cela. Ensuite les hélices F et G retrouvent leurs positions initiales et on retourne en (a). Les flèches rouges indiquent les mouvements de protons. Les flèches bleues indiquent les mouvements de groupes d'atomes. On a omis les hélices D et E pour plus de clarté dans les images (b) à (d). Le disque sombre relié à l'hélice F représente la chaîne côté cytoplasmique qui bouge pour ouvrir le canal côté cytoplasmique (d'après [Kühlbrand, 2000; Luecke et al., 1999]).

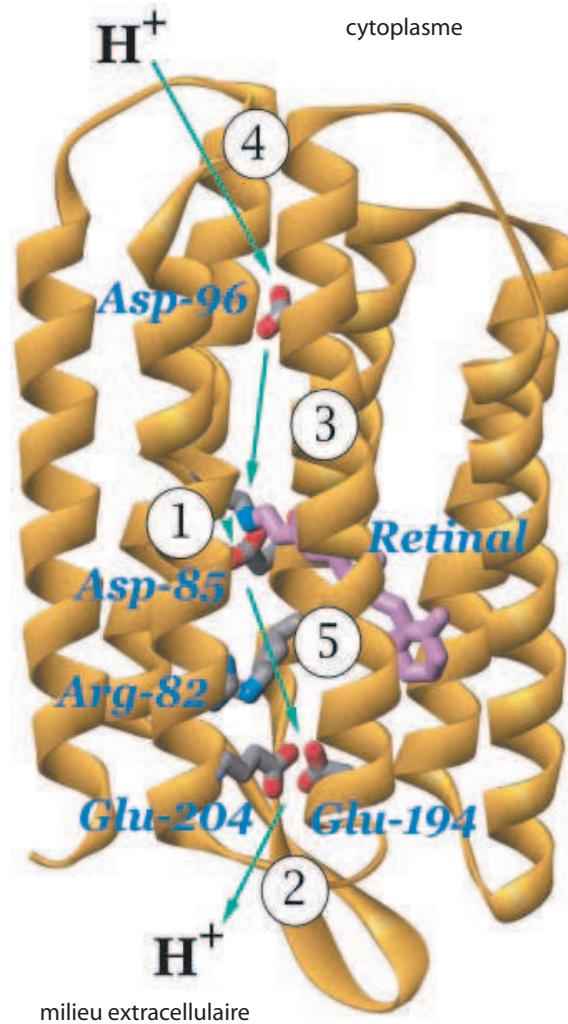


FIG. III.12 – Vue générale de la bactériorhodopsine, avec le rétinol en mauve. Les résidus impliqués directement dans le transfert du proton sont indiqués. Les flèches indiquent les étapes du transfert du proton, par ailleurs numérotées dans l'ordre : (1) déprotonation de la base de Schiff, protonation de Asp85; (2) proton relâché à la surface du côté extracellulaire; (3) reprotonation de la base de Schiff, déprotonation de Asp96; (4) reprotonation de Asp96 depuis la surface du côté cytoplasmique; and (5) déprotonation de Asp85, reprotonation du site de relargage du proton (d'après [Luecke et al., 1999]).

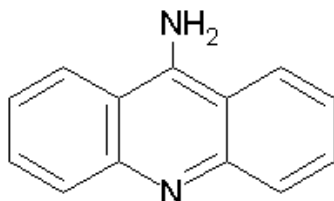


FIG. III.13 – Formule de la 9-AminoAcridine (9-AA).

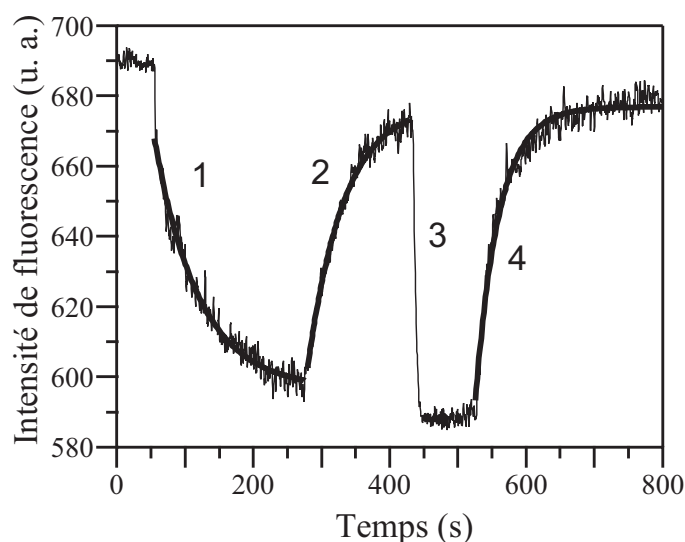


FIG. III.14 – Intensité de fluorescence de la 9-AA placée dans le milieu extérieur d'une solution de LUVs contenant la BR ; par ailleurs les milieux contiennent 2 mM de KCl et 1 mM de MOPS ramené à pH = 6.8 par du Tris (voir fig. III.16 p. 152) (voir fig. III.16 p. 152) (voir fig. III.16 p. 152). Lorsque la solution est éclairée (1), on voit une chute de la fluorescence montrant une acidification du milieu extérieur ; la première chute est due au pompage en l'absence de valinomycine, qui décroît donc à cause du potentiel électrochimique ; lorsque l'éclairage de BR est coupé (2), le pH relaxe vers sa valeur initiale. La deuxième décroissance plus abrupte (3) est due toujours au pompage de BR mais en présence de valinomycine, ce qui empêche la formation d'un gradient électrochimique. On observe même remontée (4) quand l'éclairage est arrêté (d'après [Girard, 2003]).

diminue et au-delà d'une différence de pH de 2 unités, le pompage est bloqué [Geibel et al., 2001]. Pour éviter ce problème, on peut rajouter de la valinomycine (voir fig. III.15), une molécule qui permet le passage des ions K^+ , et donc de rééquilibrer la différence de potentiel électrochimique.

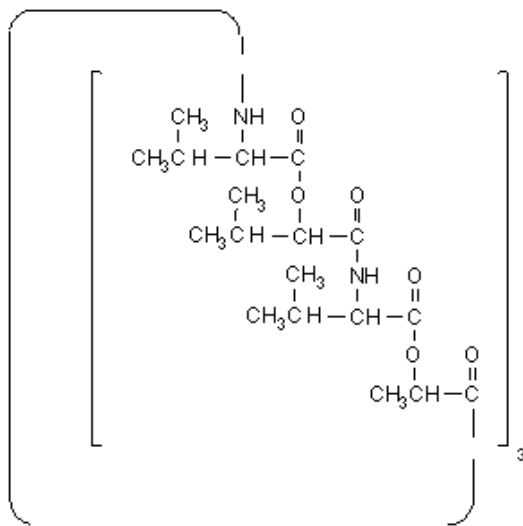


FIG. III.15 – *Molécule de Valinomycine.*

De ces tests, il ressort que la BR fonctionne normalement si elle est dans un tampon type PIPES, ou MOPS ramené à $pH = 7.1$ avec de la soude (NaOH), de la potasse (KOH) ou du tris à une concentration de 1 mM, et 2 mM chlorure de potassium (KCl) (voir pour plus de détails sur les formules de ces tampons fig. III.16) ; en effet, il semble que des ions puissent avoir un rôle dans la conformation de la protéine et son activité, bien que ce point ne soit pas élucidé complètement [Haupts et al., 1999].

Par ailleurs, en l'absence de valinomycine, un gradient électrochimique se développe entre l'extérieur et l'intérieur des LUVs ainsi qu'un gradient de pH venant inhiber l'action de la BR. Quand la protéine est activée, on observe bien un pompage. Néanmoins la membrane a une perméabilité aux protons qui explique que la protéine puisse pomper pendant une dizaine de minute. Les relaxations des différences de pH dans l'obscurité s'explique aussi de cette façon. En l'absence de valinomycine, on observe néanmoins un pompage bien que le potentiel électrochimique combiné au changement de pH qui se développe entre les deux coté de la membrane devrait rapidement inhiber son action. On peut avancer l'hypothèse que les ions Cl^- passent à travers la membrane sous forme de HCl [Seigneuret and Rigaud, 1986], ce qui permet une diffusion des protons bien supérieure à la simple perméation à travers la membrane et un abaissement de la différence de pH. En présence de valinomycine, un gradient de pH se développe, mais il n'y a pas de potentiel transmembranaire car la valinomycine permet à un K^+ de sortir, lorsqu'un proton est pompé vers l'intérieur ; on observe un pompage beaucoup plus rapide et efficace ; on peut donc avancer que la première condition limitante est le potentiel transmembranaire par rapport à la

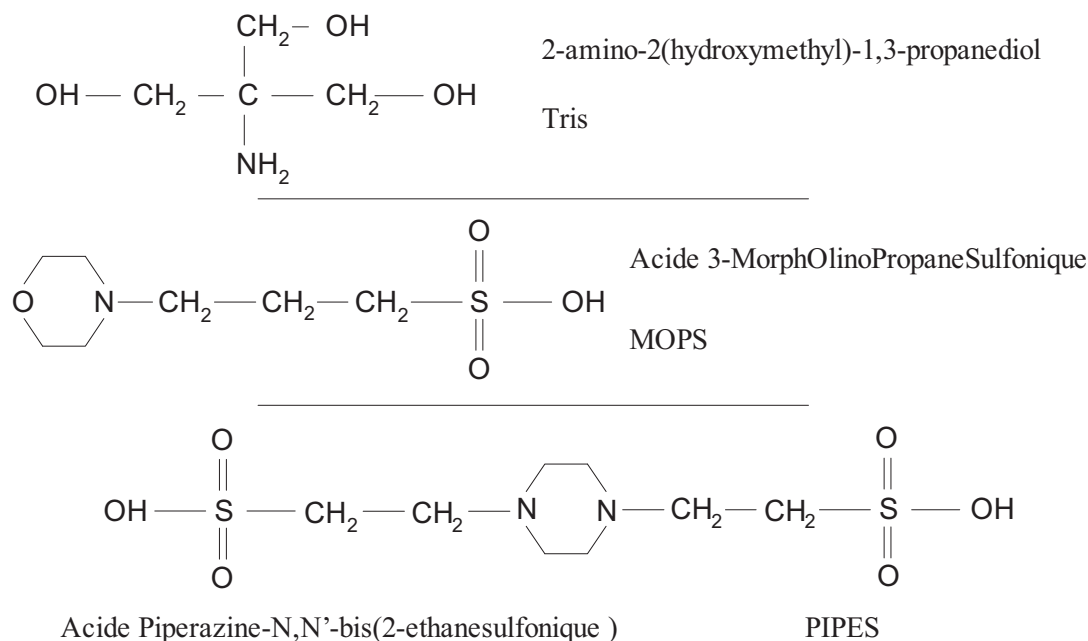


FIG. III.16 – *Formules et nomenclature des tampons Tris, MOPS, PIPES.*

différence de pH.

Notons enfin que la BR garde sa conformation lorsqu'elle est conservée dans l'eau pure ou lors de la reconstitution, même en l'absence de tampon et de sel. Néanmoins, pour être active, les concentrations minimales indiquées ci-dessus sont nécessaires. Ce sont ces concentrations que nous prendrons dans les expériences sur les GUVs contenant la BR.

Par ailleurs il est reporté par plusieurs auteurs que le glycérol et le sucre peuvent inhiber le pompage de la BR [Radionov et al., 1996]. Néanmoins aux concentrations que nous avons utilisées, nous n'avons pas noté d'inhibition notable du pompage.

D. Marquage de la protéine

Afin de s'assurer de la présence de la BR dans les GUVs que nous fabriquons et pour pouvoir s'assurer que l'on contrôle effectivement la concentration surfacique, il est utile de marquer la protéine avec une sonde fluorescente.

D.1 Le marquage

Nous avons utilisé des protéines marqués par la FITC (voir fig. III.17). Le marquage a été réalisé au laboratoire par D. Levy [Manneville, 1999, pp. 237 sq.]. On obtient un marquage de 0.7 – 1.0 molécules de FITC par BR. Le FITC se lie à l'extrémité N-terminale de la protéine, c'est-à-dire du côté extracellulaire dans le cas d'*Halobacterium Salinarium*. Le protocole est une adaptation de [Heberle and

Dencher, 1992]. La membrane pourpre est incubée à température ambiante durant 4 h dans du tampon Tris-HCl $pH = 8.5$ à 50 mM où l'on ajoute du FITC en solution à 100 mM dans le DMF (voir fig. III.18), à raison de $1.9 \mu\text{mol}$ de FITC par mg de BR. L'excès de FITC non liée est éliminé par centrifugation à 60000 g durant 20 min. La membrane pourpre marquée est alors lavée deux fois dans du tampon Tris-HCl $pH = 8.5$ et laissée toute la nuit à 4°C , puis lavée trois fois dans du KCl 0.2 M et trois fois dans de l'eau distillée.

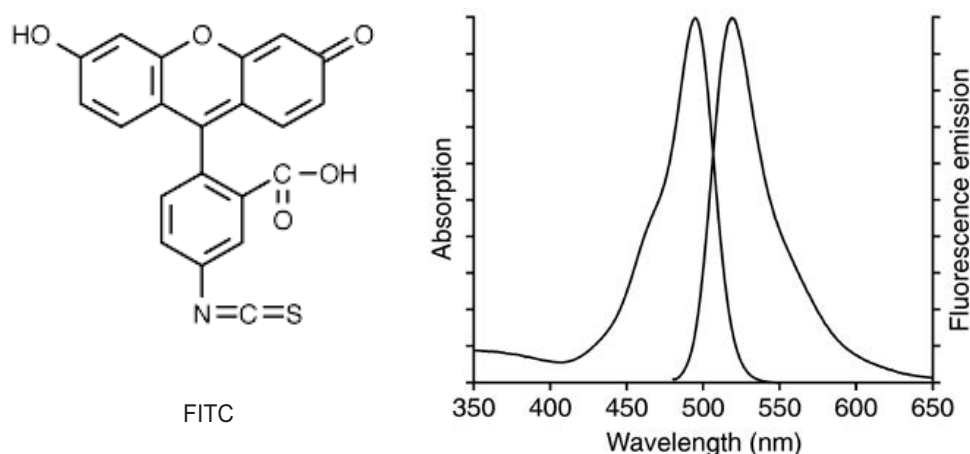


FIG. III.17 – Formule et spectre d'absorption et d'émission du FITC. On notera les maximum d'absorption $\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$, et d'émission $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$.

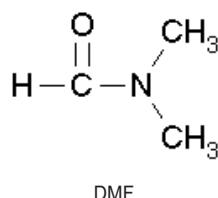


FIG. III.18 – Formule du DMF.

D.2 Limites de ce système

On pourrait à priori connaître la quantité de protéine présente dans les GUVs après reconstitution à partir de mesure de fluorescence. Le FITC est une sonde dont les propriétés sont bien connues et une telle quantification est a priori possible avec la technique de microscopie à deux photons. Néanmoins des expériences préliminaires réalisées sur un microscope à 2 photons en collaboration avec L. Moreaux (Laboratoire de Neurophysiologie, ESPCI) ont montré une fluorescence bien plus

faible que celle attendue. Cela ne signifie pas pour autant une mauvaise incorporation de la bactériorhodopsine, mais peut aussi être du à deux artefacts liés à ce marquage. D'une part le spectre d'absorption de la BR est large et la protéine peut être activée par la lumière excitant le marqueur (avec dans notre cas un éclairage à 488 nm, voir III.6 p. 141). Le FITC est sensible au pH et est positionné du côté où la protéine relargue le proton ; or l'acidification du milieu même locale due à l'activité de la protéine va diminuer la fluorescence de la FITC. D'autre part, d'après le spectre d'émission de FITC, reproduit fig. III.17, un transfert de fluorescence (FRET) est possible depuis le FITC vers le rétinale de la BR ; en effet les expériences en 2 photons, en utilisant un laser polarisé ont permis de déterminer que le FITC avait son axe dipolaire tangent à la membrane, donc quasi-parallèle à celui du rétinale, ce qui favorise d'autant plus un éventuel transfert. Devant ces artefacts, nous n'avons pas poussé plus avant la tentative de quantification absolue de la BR dans les membranes des GUVs.

D.3 Améliorations possibles

Une amélioration possible serait la mise au point d'un marquage avec une autre molécule. [Kahya et al., 2001] mentionne un marquage à l'aide d'un Alexa 488^g. La molécule d'Alexa n'est pas sensible au pH comme FITC, et en sélectionnant un Alexa avec une longueur d'onde plus grande (633 nm par exemple) de sorte qu'aucun transfert ne soit possible, on peut raisonnablement espérer mesurer la quantité de BR incorporée dans les membranes. Néanmoins quelques expériences préliminaires pour faire ce marquage ne nous ont pas permis de mettre au point un protocole efficace pour ce marquage.

E. Fabrication de protéoliposomes géants

Diverses méthodes ont été proposées sur la base des méthodes utilisées pour les vésicules purement lipidiques, pour fabriquer des protéoliposomes. Nous ne citerons que les principales. Tout d'abord chronologiquement un mélange en éther de lipides et protéines a été utilisé pour réaliser le dépôt pour l'électroformation ; cette méthode développée au laboratoire par J.-B. Manneville en collaboration avec D. Levy et J.-L. Rigaud sera détaillée au § E.1. Nous verrons les limites de cette approche. Une méthode utilisant un peptide de fusion a ensuite été proposée dans [Kahya et al., 2001] ; son avantage est de ne pas utiliser de solvant organique, néanmoins elle implique une composition lipidique particulière de la membrane, et la présence par ailleurs du peptide de fusion, ce qui d'un point de vue physique rend le système plus complexe. Enfin nous expliquerons § E.2 p. 156 la méthode que nous avons développée et qui permet d'éviter le passage par un solvant organique tout en utilisant des lipides de composition contrôlée.

^g. portant une fonction succinimidyl.

E.1 Ancienne méthode (Manneville, Levy et Rigaud)

Nous allons voir la première méthode de préparation du dépôt de lipides + BR utilisée pour obtenir des protéoliposomes géants. Elle avait été mise au point par Jean-Baptiste Manneville en collaboration avec Jean-Louis Rigaud et Daniel Levy [Manneville et al., 1999; Manneville, 1999; Manneville et al., 2001] (Elle a été utilisée au début de ces travaux puis modifiée pour les raisons que nous allons voir).

E.1.1 Solution de lipides et BR

Ces chercheurs ont exploité la propriété remarquable de la BR de conserver sa conformation native lorsqu'elle est solubilisée dans l'éther ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$) ; c'est en effet une propriété quasiment unique pour une protéine membranaire. Les lipides étant solubilisés initialement dans le chloroforme, la quantité de solution nécessaire pour préparer le mélange lipides/BR sera d'abord passée à l'évaporateur rotatif afin d'ôter le solvant, puis dans une enceinte à vide, et enfin resolubilisée dans l'éther à une concentration de 0.5 mg/ml.

Dans le même temps, une suspension de membrane pourpre dans l'eau pure est congelée rapidement en trempant l'éppendorf dans l'azote liquide, puis rapidement mis dans une enceinte à vide, munie d'un piège à eau, afin de provoquer la sublimation de la glace ainsi formée et de lyophiliser la protéine.

Ce lyophilisat est mélangé à la solution de lipides en éther préparée précédemment et maintenu dans la glace afin de limiter l'évaporation de l'éther ; il faut ensuite agir rapidement. La solution est brièvement passée au sonicateur à pointe afin de détruire les cristaux de BR et les agrégats, mais à une puissance assez faible et durant un temps assez court (quelques secondes) pour éviter toute dénaturation de la protéine. Ensuite 10 μl de solution sont séchés sur chaque lame de pousse de manière identique à celle du § A.2 p. 132.

Enfin l'électroformation est faite comme décrit au § A.3 p. 133.

E.1.2 Limites

Les limites de ce processus sont de deux ordres :

- la reconstitution de la protéine dans les liposomes peut être inhomogène. Comme nous utilisons de la membrane pourpre, donc des morceaux de membrane cristallins à deux dimensions et que la lyophilisation peut aussi produire des agrégats de BR, il est probable que, malgré la sonication, il reste des agrégats dans la membrane. On peut d'ailleurs noter sur des images de fluorescence des inhomogénéités le long de la membrane, (fig. III.19). Il est donc important de préparer un mélange homogène de lipides et de protéines avant la formation des GUVs.
- Par ailleurs, il est important de développer un protocole qui n'utilise pas de un solvant organique comme l'éther, de façon à pouvoir l'utiliser pour d'autres protéines que la BR.

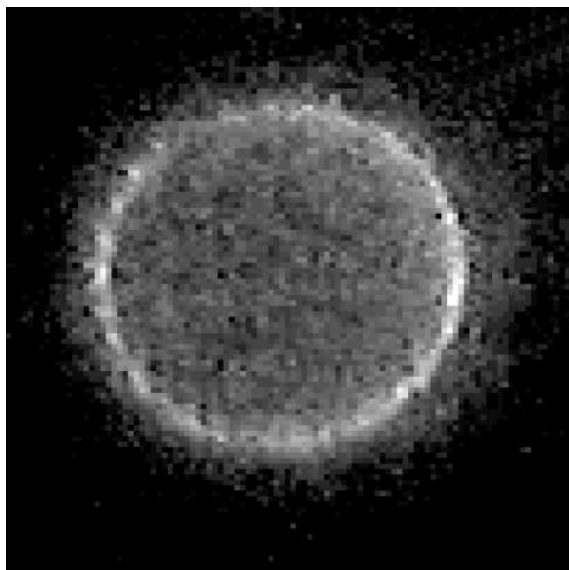


FIG. III.19 – Image de la fluorescence d'un protéoliposome géant d'EPC, dont la membrane contient la BR marquée FITC. Et préparé avec l'ancienne méthode de fabrication (voir E.1). On notera l'inhomogénéité de la fluorescence révélatrice de l'inhomogénéité de la reconstitution de la protéine dans la membrane (d'après [Manneville, 2000]).

E.2 Nouvelle méthode de préparation des protéoliposomes géants

Le principe de la méthode que nous avons mise au point avec J.-L. Rigaud (sur une suggestion de P. Méléard) consiste à utiliser des petits protéoliposomes comme mélange de départ, puis à les sécher et pour former ensuite les GUVs comme précédemment. Cette méthode a été ensuite étendue à une autre protéine membranaire, l'ATPase Ca^{2+} par P. Girard au laboratoire. L'étape de séchage a été en particulier bien contrôlée pour cette protéine, plus fragile que la BR. Ces travaux sur la reconstitution de deux protéines membranaires en GUVs ont donné lieu à un article [Girard et al., 2004b]. Le protocole doit pouvoir être étendu maintenant à d'autres protéines.

Pour obtenir un mélange initial homogène de lipides et de protéines, la première étape a donc consisté à reconstituer la protéine en petits liposomes en utilisant les protocoles développés par Rigaud et al. [Rigaud et al., 1988; Levy et al., 1992; Rigaud and Levy, 2003]. Le principe est décrit sur le schéma de la figure III.20.

On prépare une solution de SUVs à 2 mg/ml. Pour cela on utilise une solution de lipides en chloroforme à 0.5 mg/ml, préparée comme indiqué au § A.1 p. 132, dont on va évaporer le solvant à l'évaporateur rotatif dans un petit ballon, puis terminer d'ôter le chloroforme dans une enceinte à vide (pression inférieure à 10 Pa). Puis, dans le ballon, on rajoute de l'eau ultra-pure pour atteindre une concentration de 2 mg/ml. L'ensemble est vortexé afin de mélanger l'eau au dépôt sur la paroi du ballon. A ce stade, la solution est laiteuse. Enfin l'ensemble est passé au sonicateur

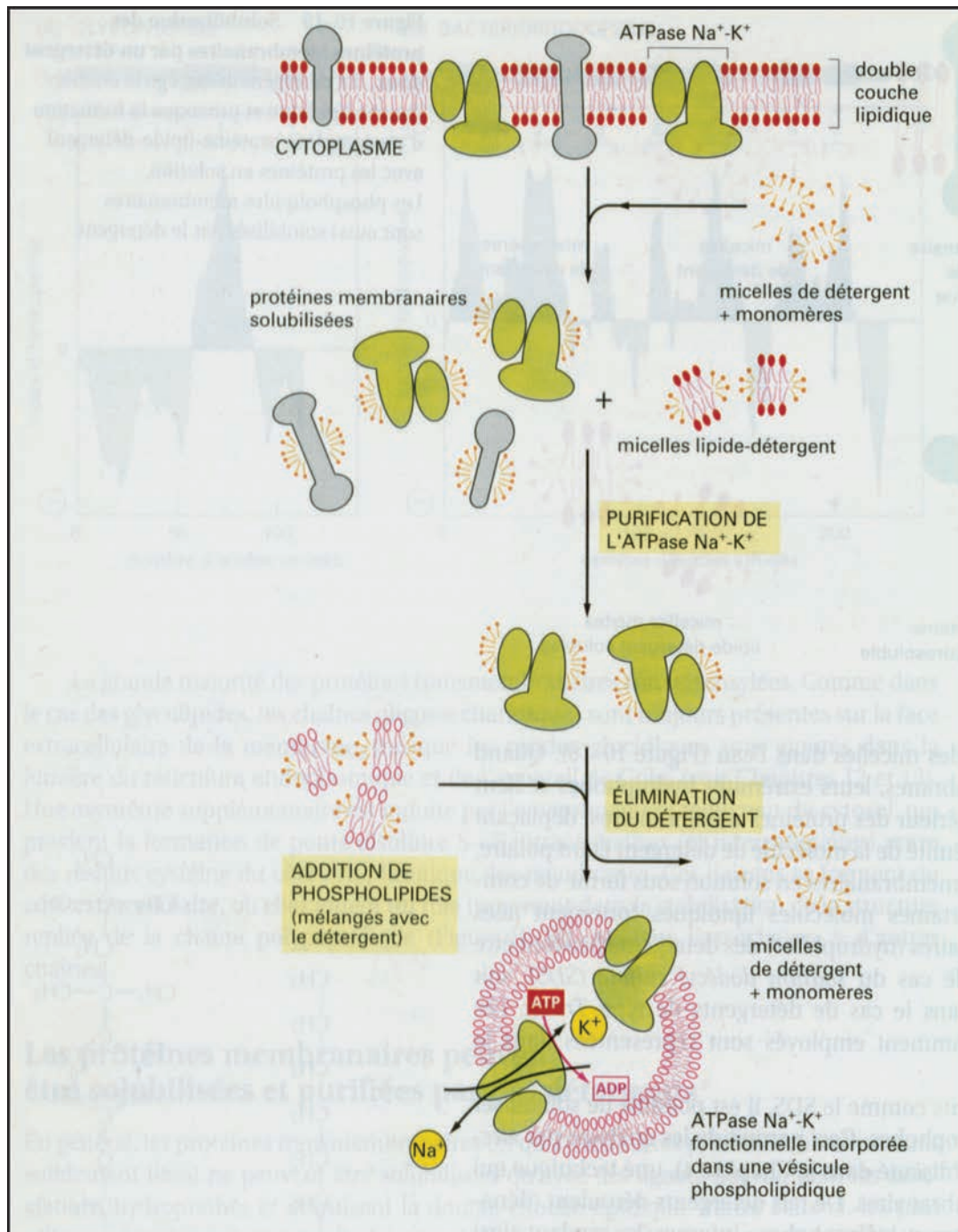


FIG. III.20 – Représentation schématique des étapes de reconstitution d'une protéine membranaire en petits liposomes (ici dans le cas de l'ATPase Na^+-K^+ , il y a dans ce protocole une étape de purification que nous n'avons pas à réaliser puisque la membrane pourpre ne contient que la BR) (d'après [Alberts et al., 1989]).

à pointe durant quelques minutes afin de former des SUVs ; la solution devient alors limpide, ce qui témoigne de la diminution de la taille des objets. Cette solution peut être conservée par congélation à l'azote liquide puis à -80°C . Il faut cependant veiller à ne pas faire subir à la solution de SUVs un nombre trop grand de cycle congélation/décongélation, qui ont pour effet de faire grossir la taille des vésicule par un phénomène connu sous le nom de *freeze-thraw* (congélation-décongélation).

E.2.1 Solubilisation de la protéine

La protéine doit être solubilisée avant son incorporation dans la membrane. Comme elle comporte des régions très hydrophobe, on ajoute pour cela un détergent, le triton X100 (voir fig. III.21) de sorte que le rapport Triton (en % masse/volume, soit mg/ml) sur la concentration de BR soit 0.2. On va alors agiter avec un agitateur magnétique ce mélange au moins 12h en chambre froide afin de permettre une dissolution des agrégats cristallins de BR sous forme de micelle mixte contenant à la fois des lipides natifs, une protéine et du détergent (voir fig. III.20). A ce stade,

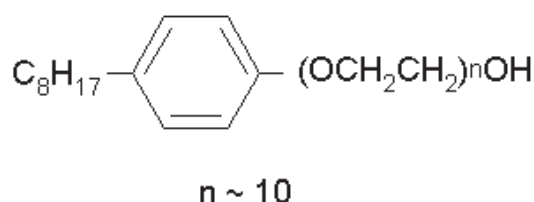


FIG. III.21 – Formule du Triton X100.

la BR est très sensible à la lumière et peut se dénaturer sous l'action de celle-ci. On prendra donc toutes les précautions nécessaire pour protéger les échantillons de la lumière. Par ailleurs sous cette forme de micelle, la BR se dénature peu à peu même dans l'obscurité, on veillera donc à utiliser la BR solubilisée sous au plus 36 h.

E.2.2 Reconstitution en petits liposomes

On va maintenant mélanger la protéine solubilisée avec les SUVs préparées précédemment et avec du détergent, de sorte que le rapport poids/poids détergent sur lipide soit égal à deux. On laisse incuber 30 min, puis à l'aide de billes de polystyrène poreuses (*Biobeads* SM2) on retire le détergent par adsorption. Les *Biobeads* sont injectées à raison de 40 mg par mg de Triton TX100 et ont préalablement été rincées au méthanol puis à l'eau ultra-pure. Le mélange est maintenu sous agitation durant 4 h. On obtient alors des SUVs contenant le lipide choisi, du lipide natif qui vient avec la BR et des traces de détergents ($< 1\%$) [Rigaud et al., 1998]. D'après les expériences que nous avons faites, on peut aller jusqu'à un rapport poids/poids lipides sur protéines de 7^{h} dans les SUVs pour pouvoir fabriquer des GUVs.

h. soit dans le cas de la BR en SOPC (Masse moléculaire 788 g/mol) un rapport molaire de 231 lipides pour 1 protéine.

Ces petites vésicules peuvent être conservées de la même manière que les SUVs purement lipidiques obtenues précédemment.

E.2.3 Le dépôt

Le principe est de déposer une petite quantité de SUVs contenant la BR, de sécher partiellement l'ensemble puis de regonfler le tout par électroformation. Pour déterminer les concentrations optimales (en lipides) des solutions de SUV permettant la fabrication des GUVs, on pratique des tests systématiques en déposant des quantités variant de 0.5 à 2 μ l avec des concentrations de lipides entre 0.1 et 1.4 mg/ml sur des lame de verre recouvertes d'ITO. On a montré ainsi qu'il y avait un optimum pour une concentration entre 0.8 et 1 mg/ml avec des gouttes de 2 μ l. Le séchage partiel se fait ensuite en plaçant cette lame une nuit dans une enceinte où la pression partielle de vapeur d'eau est fixée ; pour cela, on place au fond de l'enceinte une solution aqueuse, saturée en chlorure de sodium (NaCl). Enfin on fait pousser de la même manière que dans le cas des vésicules purement lipidiques.

E.3 Tests de la nouvelle méthode

Nous avons effectué un certain nombre de tests sur les GUVs obtenues par cette dernière méthode afin de valider le procédé en s'assurant qu'on contrôle bien les concentrations de protéines incorporées d'une part, mais aussi pour s'assurer que la protéine reste dans une conformation active après la réincorporation et l'électroformation des liposomes géants.

E.3.1 Vésicules purement lipidiques

Dans un premier temps, nous avons fabriqué avec les mêmes protocoles de dépôt de SUVs, des vésicules géantes ne contenant qu'un lipide. Pour cela, deux voies étaient possibles, la première consiste à déposer directement la solution de SUVs obtenue après sonication, sans ajout de Triton X100 ; la seconde voie consiste à ajouter du détergent aux mêmes proportions que pour les protéoliposomes pour ensuite le retirer grâce aux *biobeads*. Dans les deux cas, on obtient des GUVs de morphologie normale. Néanmoins, il apparaît qu'il reste probablement des traces de détergent dans les SUVs car les SUVs préparées avec du détergent n'ont pas le même comportement que les SUVs obtenues directement par sonication. En effet des expériences par AFM de bicouches supportées préparées à partir de ces deux types de SUVs montrent des différences [Rieu, 2002]. En effet l'organisation et la topologie des bicouches se révèlent assez différentes. Par ailleurs, dans le cas des protéoliposomes, comme le montreront les tests, il n'y a pas de conséquence notable sur l'activité de la BR [Rigaud et al., 1998].

E.3.2 Absence d'aggrégats de BR dans la membrane

La BR se présente naturellement sous forme de cristaux à deux dimensions, et peut donc former des aggrégats dans la membrane. Néanmoins au-delà d'une certaine taille ces aggrégats deviennent détectables en microscopie de fluorescence, sous la forme d'inhomogénéité de la fluorescence de la membrane (voir fig. III.19 p. 156). Avec notre protocole, nous n'avons pas pu observer de tels aggrégats. Les images en microscopie confocale de GUVs contenant la BR marquée à la FITC montre une répartition très homogène de la protéine dans la membrane. La solubilisation par un détergent de la « membrane pourpre » détruit complètement l'arrangement cristallin de la BR et mélange donc correctement les lipides et la protéine (voir fig. III.22).

Une série d'expériences de FRAP en microscopie à 2-photons pourraient permettre la mesure du coefficient de diffusion de la protéine dans la membrane et remonter ainsi à la taille d'éventuels aggrégats [Waharte, 2002]. Ces informations seraient utiles, surtout pour détecter des aggrégats de petites tailles comme il est suggéré par certains auteurs [Gulick-Krzywicki et al., 1987] ; ou encore pour détecter la formation d'aggrégats dus à l'activité de la BR elle-même [Kahya et al., 2002].

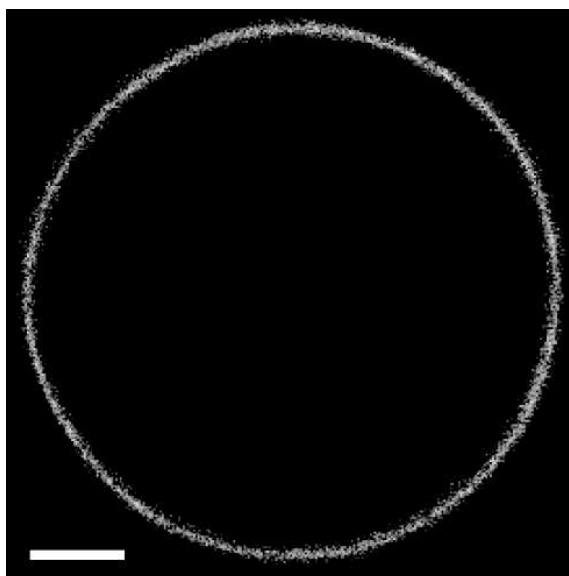


FIG. III.22 – Image d'une GUV contenant de la BR obtenue par la nouvelle méthode de reconstitution ; le rapport poids/poids lipides sur protéines est 7 (soit 231 mol/mol). Cette image a été obtenue grâce à un marquage FITC de la protéine. La vésicule est observée en microscopie confocale. La barre représente 5 μm .

E.3.3 Contrôle de la quantité de BR incorporée

Nous avons vérifié par des mesures de fluorescence (en microscopie confocale) qu'il y avait bien une relation linéaire entre la quantité de BR incorporée à l'origine dans les SUVs, et la quantité de BR dans les GUVs à la fin. Nous avons pu montrer

que la fluorescence des GUVs varie linéairement avec la proportion BR/lipide utilisé, comme on le voit fig. III.23. Comme nous l'indiquions précédemment (voir D p. 152), une mesure absolue n'a pas été possible ; néanmoins, nous supposons à partir de cette mesure relative que le rapport protéines/lipides effectif dans les GUVs correspond à celui dans les SUVs, qui est connu. Par ailleurs la distribution de fluorescence est homogène d'une vésicule à l'autre dans la préparation, contrairement à l'ancienne méthode de fabrication ; on peut donc étudier une GUV sans mesurer sa fluorescence.

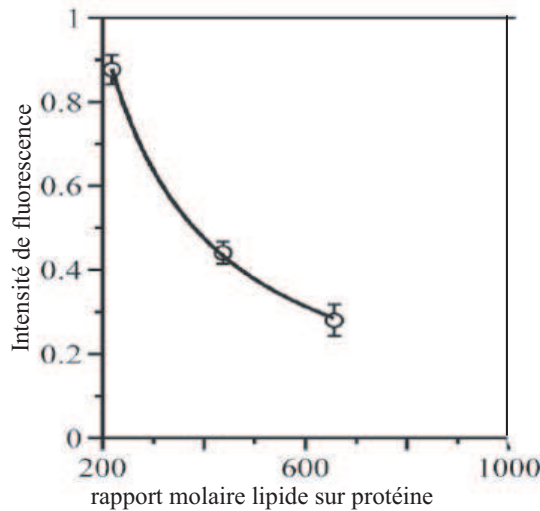


FIG. III.23 – *Intensité de fluorescence observée pour des GUVs contenant BR, en fonction du rapport massique lipide sur protéine (d'après [Girard et al., 2004b]).*

E.3.4 Contrôle de l'activité de la BR reconstituée

Nous avons réalisé plusieurs tests : un test par Spectroscopie d'absorption pour vérifier que la protéine n'est pas dénaturée, un test d'activité proprement dit sur les petits liposomes, et enfin un test d'activité sur les GUVs.

- Le premier test consiste à solubiliser la bactériorhodopsine en micelle avec un détergent non dénaturant (Triton X100), puis à mesurer son spectre d'absorption pour vérifier que le maximum d'absorption se trouve bien à 568 nm (voir fig. III.6 p. 141) ; en effet lorsque la BR se dénature et libère le rétinale, le maximum d'absorption se trouve déplacé, et la protéine apparaît jaune. Ce premier test ne permet pas de s'assurer de l'activité de la protéine mais a le mérite d'être facile à mettre en œuvre et d'éliminer un certain nombre de cas où la BR est dénaturée. Nous avons effectué ce test après la reconstitution sur les SUVs et sur des GUVs dont la membrane contenait la BR.
- Les expériences de contrôle de l'activité de la BR en petits liposomes ont été réalisés par P. Girard et ont été décrites précédemment au § C p. 145. Il a ainsi

montré que la protéine reconstituée dans les SUVs était encore active avant la fabrication du dépôt sur la lame de verre.

- Enfin le dernier contrôle a été réalisé, en collaboration avec P. Girard, sur des GUVs après électroformation et permet de s'assurer que le séchage et l'électroformation ne dénature pas la BR. Cette mesure est inspirée de la mesure de l'activité de BR sur des LUVs mise au point par Seigneuret et Rigaud [Seigneuret and Rigaud, 1985; Seigneuret and Rigaud, 1986]. Pour cela nous avons déposé des SUVs contenant la BR et les avons préparées selon le protocole que nous avons décrit précédemment. L'électroformation a été réalisée dans le milieu habituel (MOPS 1 mM, ramené à $pH = 7.1$ par de la soude, KCl 2 mM, Sucrose 50 mM) auquel on avait ajouté $10 \mu M$ de pyranine ; cette molécule (voir fig. III.24) est une sonde fluorescente soluble dans l'eau à faibles concentrations, et dont la fluorescence dépend du pH (Elle décroît quand le pH diminue). Sa longueur d'onde d'excitation est 450 nm, et son émission est me-

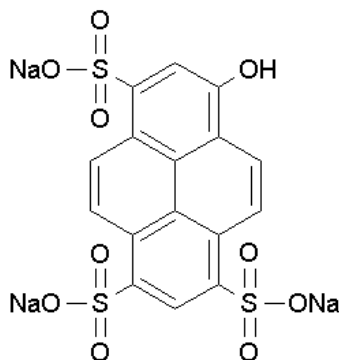


FIG. III.24 – *Formule chimique de la Pyranine*

surée entre 505 nm et 530 nm. La variation de la fluorescence permet de déceler une variation de pH (voir fig III.25). L'injection d'une faible quantité ($10 \mu l$) de GUVs dans la chambre d'observation ($500 \mu l$) permet de diluer la pyranine à l'extérieur des vésicules mais pas à l'intérieur.

La fluorescence des GUVs est observée en microscopie confocale afin de ne pas être gêné par la fluorescence du fond. La BR est excitée par une lampe halogène extérieure munie d'un filtre passe haut à 475 nm. Néanmoins comme nous devons éclairer la préparation pour la mise au point avant les mesures de fluorescence, on ne peut pas mesurer la fluorescence initiale de la GUV et on ne recueille que la fin de l'exponentielle attendue pour la variation de pH (supposée linéaire dans le domaine étudié avec la variation de fluorescence) ; deux types de variation de la fluorescence ont été obtenues, soit décroissante, soit croissante que nous discuterons dans le paragraphe suivant. Cette variation indique que la protéine est bien activée par la lumière. On obtient ensuite une saturation pour les mêmes raisons déjà expliquées pour les SUVs au § C p. 145. Une fois l'éclairement stoppé, cette relaxation est due à la fuite des ions à travers la membrane, selon une cinétique exponentielle dont nous avons les

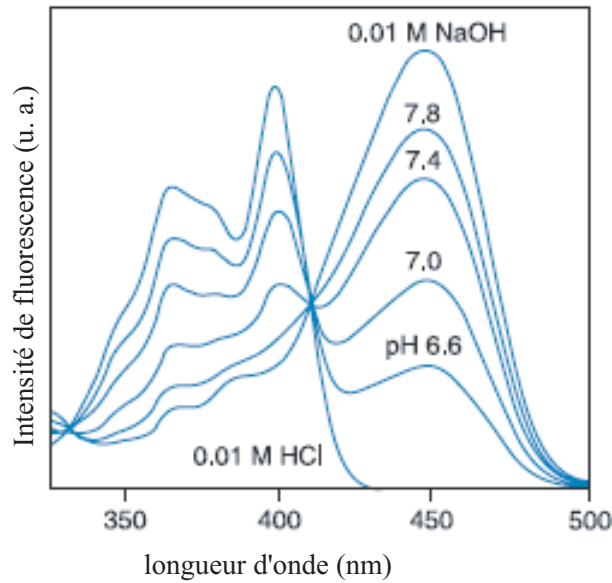


FIG. III.25 – Absorption de la pyranine en fonction du pH

premiers pointsⁱ. Les courbes sont présentées fig. III.26 avec les mesures de l'intensité de fluorescence de la GUV brute, et corrigée du photoblanchiment (*photobleaching*) dû à l'éclairage par le laser du microscope confocal. On voit sur ces courbes que l'activité de la protéine est bloquée en typiquement 10 minutes, ce qui signifie que les acquisitions de contours doivent être réalisées sur 3 à 4 minutes maximum. De plus, les fuites sont plus lentes que sur les SUVs (15 minutes au lieu de 3 minutes) probablement à cause de la tension des SUVs qui est plus élevée.

E.3.5 incorporation symétrique

L'activité a été mesurée sur 15 vésicules. Dans deux tiers des cas on obtient une diminution de la fluorescence à l'intérieur de la GUV, due à l'action combinée du photoblanchiment et de l'acidification du milieu due au pompage des protons par la BR. On obtient aussi 1/3 des vésicules où la fluorescence augmente lorsqu'on active la BR, ce qui témoigne du pompage de protons vers l'extérieur. Cela nous amène à la conclusion que malgré une orientation préférentielle de la BR dans les LUVs [Girard et al., 2004b], il n'y a probablement pas d'orientation préférentielle notable dans les GUVs et que l'orientation est proche de la symétrie, avec des fluctuations d'une vésicule à l'autre conduisant à un pompage net vers l'intérieur ou l'extérieur.

Nous avons évalué le temps de pompage nécessaire pour atteindre un changement de une unité de pH, en tenant compte de l'incorporation des protéines dans les deux

i. Pour plus de détail sur la cinétique de pompage de BR, on pourra se reporter à [Hellingwerf et al., 1979; Arents et al., 1981; Westerhoff et al., 1981].

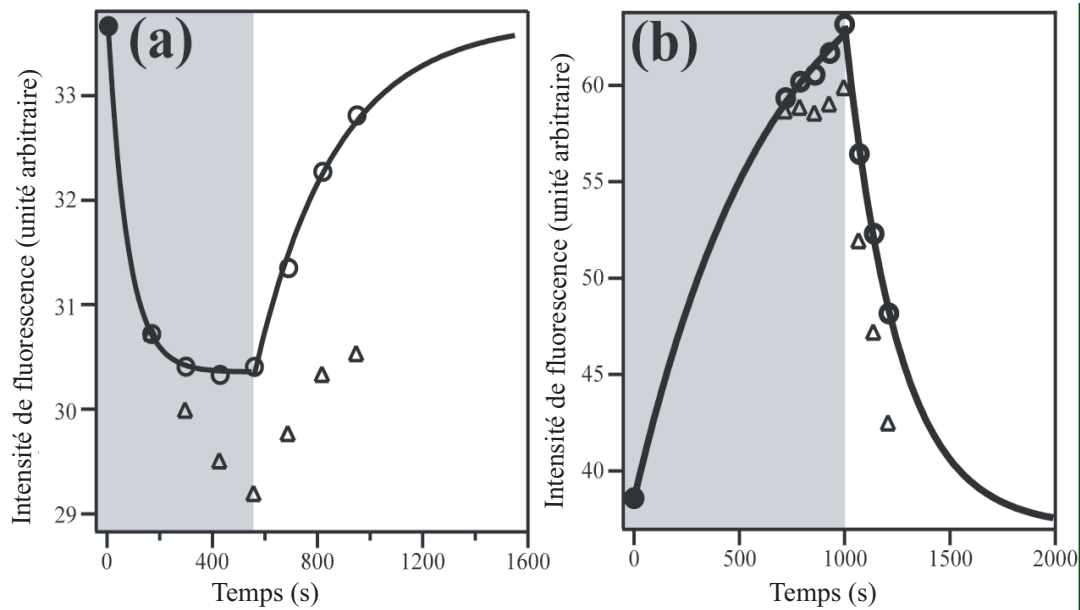


FIG. III.26 – Fluorescence de la pyranine à l'intérieur de GUVs contenant BR. Les GUVs sont composées de SOPC, et BR à un rapport massique de 7 (rapport molaire 231:1). La partie grisée représente la période d'illumination de la BR et donc de pompage des protons. La partie blanche représente le rééquilibrage de pH par fuite des protons à travers la membrane. Les triangles correspondent à la mesure directe de la fluorescence et les cercles à la mesure corrigée du photoblanchiment. Le point initial de chaque graphique est la fluorescence initiale extrapolée, sachant que cette mesure nous est inaccessible car la BR a déjà été éclairée lors de la mise en place de la préparation et de la recherche de la vésicule sur laquelle faire les mesure. Les cas (a) et (b) représentent les deux possibilités d'insertion de la protéine qui conduisent à un pompage net vers l'intérieur ou l'extérieur respectivement (d'après [Girard et al., 2004b]).

sens, et d'une éventuelle asymétrie d'incorporation. Les expériences sont faites dans du tampon MOPS à 1 mM ramené à $pH = 7.1$ avec de la soude. A partir de la définition du Ka , du pH , et des lois de conservation de la masse, il vient immédiatement que la concentration en soude rajoutée pour amener le pH à 7.1 est 0.44 mM. En l'absence de transporteur comme la valinomycine, on sait que l'électroneutralité va être violée à cause des protons pompés ; de plus l'écart entre les charge positives et négatives va correspondre au nombre de protons pompés. Pour obtenir cette valeur, on écrit les lois de conservation de la masse, l'équilibre entre les espèces acides et basiques de MOPS (caractérisé par le $pKa = 7.2$), le produit ionique de l'eau pKe , $\mathcal{N}_a = 6.022 \times 10^{23}$ le nombre d'Avogadro. On obtient alors, pour une vésicule de rayon R , le nombre de protons pompés vers l'intérieur pour atteindre une valeur de pH depuis $pH = 7.1$, C_{NaOH} étant la concentration introduite en soude et C_{MOPS} la concentration introduite en MOPS :

$$N_{H^+} = \frac{4}{3}\pi R^3 \mathcal{N}_a \left[10^{-pH} + C_{NaOH} - C_{MOPS} + \frac{C_{MOPS}}{10^{-pKa+pH} + 1} - 10^{-pKe+pH} \right] \quad (\text{III.2.1})$$

Par ailleurs une vésicule de rayon R , ayant un rapport poids/poids ρ lipides sur protéines, contient un nombre de protéines N_{BR} suivant, avec $S_{BR} = 8.75 \text{ nm}^2$ la surface de membrane occupée par une BR, $S_{SOPC} = 0.5 \text{ nm}^2$ celle occupée par une tête PC de lipide SOPC, $M_{BR} = 26000 \text{ g/mol}$ et $M_{SOPC} = 788.14 \text{ g/mol}$ étant les masses molaires de BR et SOPC respectivement :

$$N_{BR} = \frac{4\pi R^2}{S_{BR} + \frac{M_{BR}}{M_{SOPC}} \frac{\rho}{2} S_{SOPC}} \quad (\text{III.2.2})$$

Si ζ est la fraction de BR pompant vers l'intérieur, alors on peut calculer le temps nécessaire à l'obtention d'une valeur donnée de pH partant de la valeur 7.1, avec un proton pompé chaque $\tau = 10 \text{ ms}$

$$t = \tau \frac{N_{H^+}}{(2\zeta - 1)N_{BR}} \quad (\text{III.2.3})$$

Avec les valeurs numériques indiquées ci-dessus, une vésicule de rayon $10 \mu\text{m}$, un rapport massique lipide sur BR de $\rho = 7$, on peut tracer le temps d'obtention d'une différence d'une unité de pH depuis 7.1 soit $pH = 6.1$ en fonction de la fraction molaire de BR pompant vers l'intérieur (voir fig. III.27). Les temps caractéristiques de nos expériences sont de l'ordre de 15 minutes. Compte tenu de la sensibilité de la pyranine aux variations de pH (voir III.25 p. 163), dans les GUVs que nous obtenons, nos résultats montrent que la répartition d'orientation de la BR dans les GUV est très proche de la symétrie : il y a environ autant de protéines pompant vers l'intérieur que vers l'extérieur.

E.4 Conclusion

Nous avons donc obtenu un mode de préparation des GUVs contenant la BR, bien caractérisé, où on a pu vérifier l'activité de BR, et où l'incorporation de la

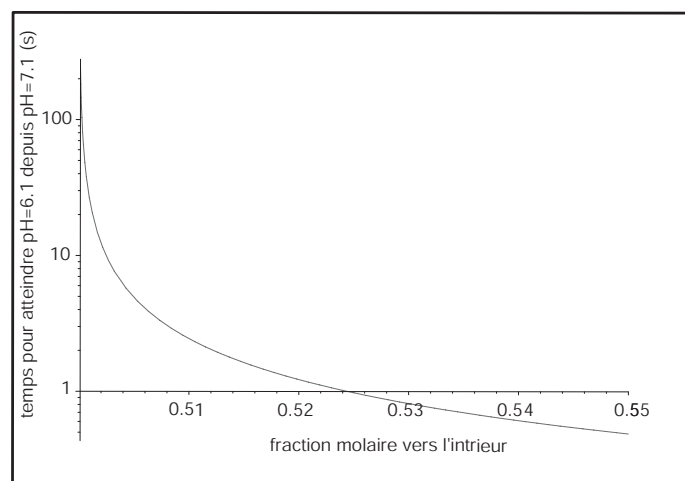


FIG. III.27 – *Temps de pompage pour obtenir $pH = 6.1$ depuis $pH = 7.1$ en fonction de la fraction molaire ζ de BR pompant vers l'intérieur.*

protéine est contrôlée et homogène. Ce système peut maintenant être étudié par analyse de contour dans le but de mesurer les effets de l'activité de la protéine sur le spectre de fluctuations.

Chapitre III.3

Mesures sur des vésicules passives



A PRES AVOIR MIS EN PLACE tous les éléments de l'expérience que nous avons conçue, nous l'avons testée en réalisant des mesures sur des membranes dont les propriétés étaient déjà décrites dans la littérature. Nous avons choisi des membranes passives constituées de lipides usuels. Dans un premier temps nous préciserons les conditions précises de ces expériences, puis nous détaillerons les outils d'analyse utilisés dans ce cas, et enfin les résultats que nous avons obtenus.

A. Protocole expérimental, traitement des données et analyse

A.1 Adaptation du protocole expérimental

Les lipides que nous avons utilisés sont l'EPC, le SOPC ou un mélange équimolaire SOPC:Chol (voir fig. III.28).

Les vésicules sont fabriquées par électroformation (voir § A.3 p. 133) à partir de dépôt de solutions de ces lipides solubilisés dans du chloroforme.

Les premières expériences ont été faites dans la chambre avec thermalisation à l'aide de module à effet Pelletier (voir § A p. 217). Par la suite nous avons travaillé dans la configuration simplifiée, la pièce étant alors climatisée. Par ailleurs, nous avons optimisé les osmolarité des solutions à l'intérieur et à l'extérieur, afin de simplifier la partie flux. Nous avons utilisé des solutions de sucrose à 50 mM à l'intérieur des vésicules (n'ayant besoin ni de tampon, ni de sels puisqu'on n'utilise à ce stade aucune protéine), et nous les transférons dans une solution de glucose à 54 mM. Le choix de ces concentrations résulte d'un compromis entre deux contraintes : d'une part la nécessité, pour avoir un contraste élevé et une reconnaissance optimale, d'avoir une différence d'indice optique suffisante entre l'extérieur et l'intérieur des vésicules ce qui conduirait plutôt à augmenter les concentrations (voir § A.1.3 p. 81) ; et d'autre part le fait de diminuer suffisamment les effets de la gravité pour ne pas avoir à prendre en compte de terme correctif (voir § A.3.4 p. 172). Nous suivons ensuite le protocole décrit au § B.2 p. 136 pour la construction de la cellule d'observation et

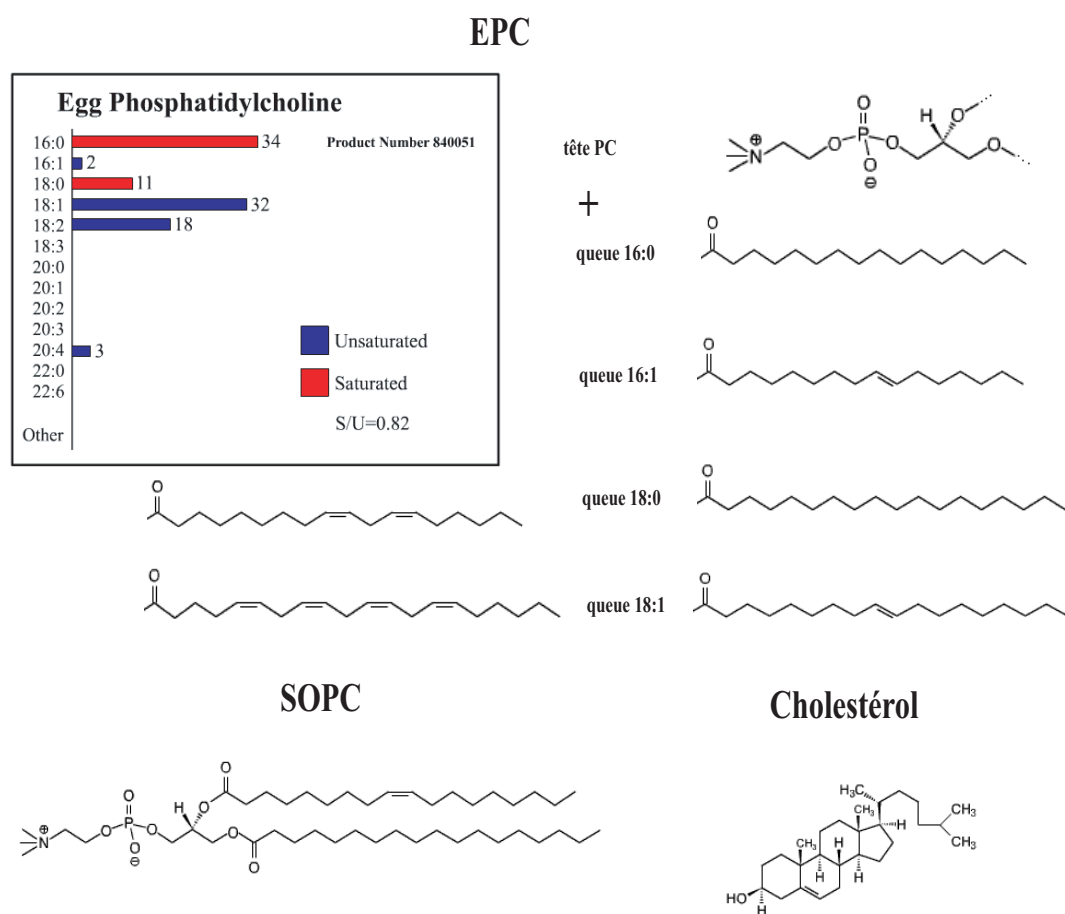


FIG. III.28 – Formules de l'EPC, du SOPC et du Cholestérol

le transfert des vésicules de la cellule de formation à la chambre d'observation.

A.2 Traitement des contours

Nous avons usuellement enregistré 2000 contours par vésicule. Par ailleurs, nous avons fait varier l'éclairement entre jaune et rouge afin de nous assurer que cela n'avait d'effet notable sur les mesures. En lumière jaune où l'intensité mesurée est plus élevée, nous avons fait varier le temps d'intégration de la caméra de 33 ms à 16 ms et 8 ms afin de tester notre méthode de correction du temps d'intégration. En dessous de 8 ms l'intensité devient trop faible pour assurer des acquisitions valables. Sur chaque contour nous avons calculé les valeurs des modes de Fourier au cours du temps, et donc la valeur de $\langle |\tilde{u}(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle$, et finalement calculé les erreurs sur ces grandeurs.

A.3 Analyse

Nous allons ici donner le détail des expressions utilisées pour le cas des vésicules passives.

A.3.1 Expression du spectre de fluctuations

Le spectre de fluctuations d'une portion de membrane plane représentée par une nappe à deux dimensions plongée dans un espace à trois dimensions est donnée, dans le cas du modèle standard de courbure (voir § B.1.2 p. 11 et tableau I.2 p. 15) dans lequel nous nous placerons, par l'expression [Helfrich and Servuss, 1984] :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp)|^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma \mathbf{q}_\perp^2 + \kappa \mathbf{q}_\perp^4} \quad (\text{III.3.1})$$

Néanmoins comme expliqué au § B.1.5 p. 117, nous observons le contour de la vésicule dans le plan diamétral sous forme d'une courbe à deux dimensions ce qui revient à couper la membrane plane par un plan vertical ; nous pouvons fixer arbitrairement le plan de coupe comme égal à (xOz) (voir fig. II.33 p. 118). Sur l'expression précédente on obtient par transformée de Fourier inverse :

$$\langle |u(q_x, y = 0)| \rangle = \frac{kT}{2\sigma} \left[\frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right] \quad (\text{III.3.2})$$

Il faut prendre en compte l'intégration en temps faite par la caméra (voir § B.1.6 p. 119). Pour cela il faut revenir à l'équation de Langevin du système modélisée dans le modèle de courbure standard [Manneville et al., 2001; Ramaswamy, 1992] :

$$\frac{\partial u(\mathbf{q}_\perp, t)}{\partial t} + \tau_m(\mathbf{q}_\perp)^{-1} u(\mathbf{q}_\perp, t) = \lambda_p \left[f_{th}(\mathbf{q}_\perp, t) + \frac{1}{2\pi\eta\lambda_p} \int \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{q}, t) \cdot \mathbf{k}}{q^2} dq_z \right] \quad (\text{III.3.3})$$

où

$$\tau_m(\mathbf{q}_\perp)^{-1} = \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q_\perp} \right) (\sigma q_\perp^2 + \kappa q_\perp^4) \quad (\text{III.3.4})$$

est le temps caractéristique de relaxation d'une fluctuation, λ_p la perméation de la membrane, η la viscosité du milieu environnant la membrane, $\mathbf{f}_h$ est la force stochastique modélisant le bruit thermique en volume et f_{th} le bruit thermique sur la membrane et $q_\perp = \|\mathbf{q}_\perp\|$. Comme nous le notions au § A.3 p. 47, dans notre gamme de vecteur d'onde $q_\perp$ la relaxation visqueuse domine soit

$$\lambda_p \ll \frac{1}{4\eta q_\perp} \quad (\text{III.3.5})$$

Nous noterons dans ce qui suit $\langle a \rangle$ la moyenne d'ensemble ou moyenne d'état thermodynamique de la variable a et $\bar{a}$ la moyenne sur le temps d'intégration de la caméra. La fonction de corrélation est donnée par :

$$\langle |u(\mathbf{q}_\perp, t)u(\mathbf{q}'_\perp, t')| \rangle = 4\pi^2 \frac{kT}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \tau_m(q_\perp) \exp\left(-\frac{t' - t}{\tau_m(q_\perp)}\right) \quad (\text{III.3.6})$$

Nous avons négligé les termes transitoires. La moyenne de la fonction d'autocorrélation sur le temps d'intégration de la caméra τ s'écrit alors :

$$\begin{aligned} & \langle |\bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)\bar{u}(\mathbf{q}'_\perp, t)| \rangle = \\ & \frac{2}{\tau^2} \int_{t_1=t}^{t_1=t+\tau} \int_{t_2=t_1}^{t_2=t+\tau} 4\pi^2 \frac{kT}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \tau_m(q_\perp) \exp\left(-\frac{t_2 - t_1}{\tau_m(q_\perp)}\right) dt_2 dt_1 \end{aligned} \quad (\text{III.3.7})$$

et finalement :

$$\begin{aligned} & \langle |\bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t)\bar{u}(\mathbf{q}'_\perp, t)| \rangle = \\ & 8\pi^2 \frac{kT}{4\eta q_\perp} \delta(\mathbf{q}_\perp + \mathbf{q}'_\perp) \times \tau_m \frac{\tau_m^2(q_\perp)}{\tau^2} \left[\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)} + \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)}\right) - 1 \right] \end{aligned} \quad (\text{III.3.8})$$

Ce facteur de correction dû à l'intégration en temps de la caméra est similaire à celui calculé dans [Faucon et al., 1989]. Nous devons maintenant tenir compte que nous ne regardons que la coupe par un plan équatorial de la vésicule (voir § B.1.5 p. 117), ce qui conduit à l'intégrale

$$\langle |\bar{u}(q_x, y=0, t)|^2 \rangle = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{kT}{4\eta q_\perp} \tau_m \frac{\tau_m^2(q_\perp)}{\tau^2} \left[\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)} + \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_m(q_\perp)}\right) - 1 \right] dq_y \quad (\text{III.3.9})$$

Cette intégrale est approchée numériquement en utilisant la quadrature de Gauss-Laguerre, ou la méthode de Romberg à l'aide des algorithmes proposés dans [Press et al., 1992, p. 140-156]. Ces algorithmes ne sont pas directement appliqués à l'intégrale, mais aux expressions suivantes obtenues après changement de variable. Soit dans le cas de l'algorithme de Romberg :

$$\begin{aligned} \xi &= \frac{\tau}{\tau_m(\mathbf{q}_\perp)} - \frac{\tau}{\tau_m(q_x, q_y=0)} \\ &= \frac{\tau 4\eta \sqrt{q_x^2 + q_y^2}}{\sigma(q_x^2 + q_y^2) + \kappa(q_x^2 + q_y^2)^2} - \frac{\tau 4\eta \sqrt{q_x^2}}{\sigma(q_x^2) + \kappa(q_x^2)^2} \end{aligned} \quad (\text{III.3.10})$$

et

$$\xi_0 = \frac{\tau}{\tau_m(q_x, q_y = 0)} = \frac{\tau 4\eta \sqrt{q_x^2}}{\sigma(q_x^2) + \kappa(q_x^2)^2} \quad (\text{III.3.11})$$

avec $\tilde{\xi} = \xi + \xi_0$ nous obtenons

$$\alpha = \left[\tau \left[\tau^2 \sigma^3 + 216 \kappa \tilde{\xi}^2 \eta^2 + 12 \sqrt{3} \tilde{\xi} \eta \sqrt{\frac{\tau^2 \sigma^3 + 108 \kappa \tilde{\xi}^2 \eta^2}{\kappa}} \kappa \right] \right]^{1/3} \quad (\text{III.3.12})$$

$$q_y = \frac{1}{3} \left[\frac{3\alpha}{\kappa\tau} + \frac{3\sigma^2\tau}{\kappa\alpha} - 3 \frac{3\kappa q_x^2 + 2\sigma}{\kappa} \right]^{1/2} \quad (\text{III.3.13})$$

et finalement

$$\langle |\bar{u}(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle = \frac{2kT}{\pi} \int_0^\infty \frac{1}{\tilde{\xi}^3} \left(\exp(-\tilde{\xi}) + \tilde{\xi} - 1 \right) \frac{d\xi}{q_y (3\kappa(q_x^2 + q_y^2) + \sigma)} \quad (\text{III.3.14})$$

expression sur laquelle nous appliquons l'algorithme.

Dans le cas de la quadrature de Gauss-Laguerre la nouvelle variable :

$$\zeta = \frac{q_y}{q_x} \quad (\text{III.3.15})$$

conduit à :

$$\tau_m = \frac{4\eta q_x \sqrt{1 + \zeta^2}}{\sigma q_x^2 (1 + \zeta^2) + \kappa q_x^4 (1 + \zeta^2)^2} \quad (\text{III.3.16})$$

$$\langle |\bar{u}(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle \int_0^\infty \frac{2}{\pi} \frac{kT \tau_m^3}{\tau^2} \frac{1}{4\eta q_x \sqrt{1 + \zeta^2}} \left(\frac{\tau}{\tau_m} + \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_m}\right) - 1 \right) q_x d\zeta \quad (\text{III.3.17})$$

Il faut toutefois noter que la méthode de Romberg donne des résultats plus imprécis aux petits vecteurs d'onde ($q_\perp < 10^5 \text{ m}^{-1}$) que la quadrature de Gauss-Laguerre.

On peut voir fig. II.34 p. 119 l'effet prévu théoriquement de l'intégration en temps sur les spectres de fluctuations pour les membranes passives.

A.3.2 Calcul des erreurs

Nous allons préciser dans le cas des membranes passives le calcul général des erreurs de mesure du § B.2 p. 124. Les écarts types sur κ et σ sont calculés d'après [Neuilly and CETAMA, 1998, p. 458-460]. En effet on peut écrire l'amplitude comme

$$\langle |u|^2 \rangle = f(q_x, \sigma, \kappa) \quad (\text{III.3.18})$$

avec f étant l'intégrale III.3.9. Si k indexe les P modes, $(q_k, \langle |u|^2 \rangle_k)$ sont les points qui constituent le spectre de fluctuation, les écarts-type sur la tension σ et le module de rigidité de courbure κ , respectivement σ_σ et σ_κ sont donnés par :

$$\sigma_\sigma^2 = \frac{\hat{K}}{|W|} \sum_k \left(\frac{\partial f}{\partial \sigma} \right)^2 (q_k) \times g_k \quad (\text{III.3.19})$$

et

$$\sigma_\kappa^2 = \frac{\hat{K}}{|W|} \sum_k \left(\frac{\partial f}{\partial \kappa} \right)^2 (q_k) \times g_k \quad (\text{III.3.20})$$

où

$$W = \begin{bmatrix} \sum_k \left(\frac{\partial f(q_k)}{\partial \sigma} \right)^2 g_k & \sum_k \frac{\partial f(q_k)}{\partial \sigma} \frac{\partial f(q_k)}{\partial \kappa} g_k \\ \sum_k \frac{\partial f(q_k)}{\partial \sigma} \frac{\partial f(q_k)}{\partial \kappa} g_k & \sum_k \left(\frac{\partial f(q_k)}{\partial \kappa} \right)^2 g_k \end{bmatrix} \quad (\text{III.3.21})$$

$$\frac{1}{g_k} = \left[\sigma_{\langle |u|^2 \rangle} + \left(\frac{\partial f}{\partial q_x} \sigma_q \right)^2 \right] \quad (\text{III.3.22})$$

et

$$\hat{K} = \frac{1}{P-2} \sum_k g_k \left[\langle |u|^2 \rangle_k - f(q_k, \sigma, \kappa) \right]^2 \quad (\text{III.3.23})$$

où $\sigma_{\langle |u|^2 \rangle}$ est l'écart-type sur la mesure de $\langle |u|^2 \rangle$ et σ_q celui sur la mesure de q . On retrouvera une estimation des erreurs de mesure obtenues numériquement à partir de ces équations dans le tableau III.1 p. 177.

A.3.3 Procédure de fit

Afin de trouver la valeur de la tension σ et du module de rigidité de courbure κ , on approche la série de points expérimentaux par l'expression corrigée de l'intégration en temps du spectre de fluctuation. La méthode du χ^2 , avec les points pondérés par l'inverse de leur déviation standard va permettre d'obtenir une valeur de κ le module de rigidité de courbure et de σ la tension à partir des points expérimentaux. Cette procédure évite de donner un poids égal à tous les points ce qui conduirait à une surestimation des erreurs sur les premiers modes, et une sous-estimation sur les modes à grands q_x . Cela nous permet aussi avec le formalisme du paragraphe précédent d'estimer plus correctement l'erreur sur la tension et le module de rigidité de courbure, qu'avec une simple mesure de la dispersion de points (calcul simplement à partir du χ^2 à poids égaux), ce qui serait bien entendu une sous-estimation de l'erreur de mesure.

A.3.4 Effet de la gravité

A cause de la différence de densité des solutions de sucrose et de glucose (respectivement 1005.0 kg/m^3 pour le sucrose à 50 mM et 1002.0 kg/m^3 pour le glucose à 54 mM), les vésicules ont tendance à sédimenter au fond de la chambre, ce qui nous permet de les observer, car la distance de travail de l'objectif est réduite et ne

permet pas de parcourir la chambre d'observation dans sa dimension verticale. Mais ceci conduit les vésicules à se déformer sous leur propre poids (voir fig. III.29). Cet

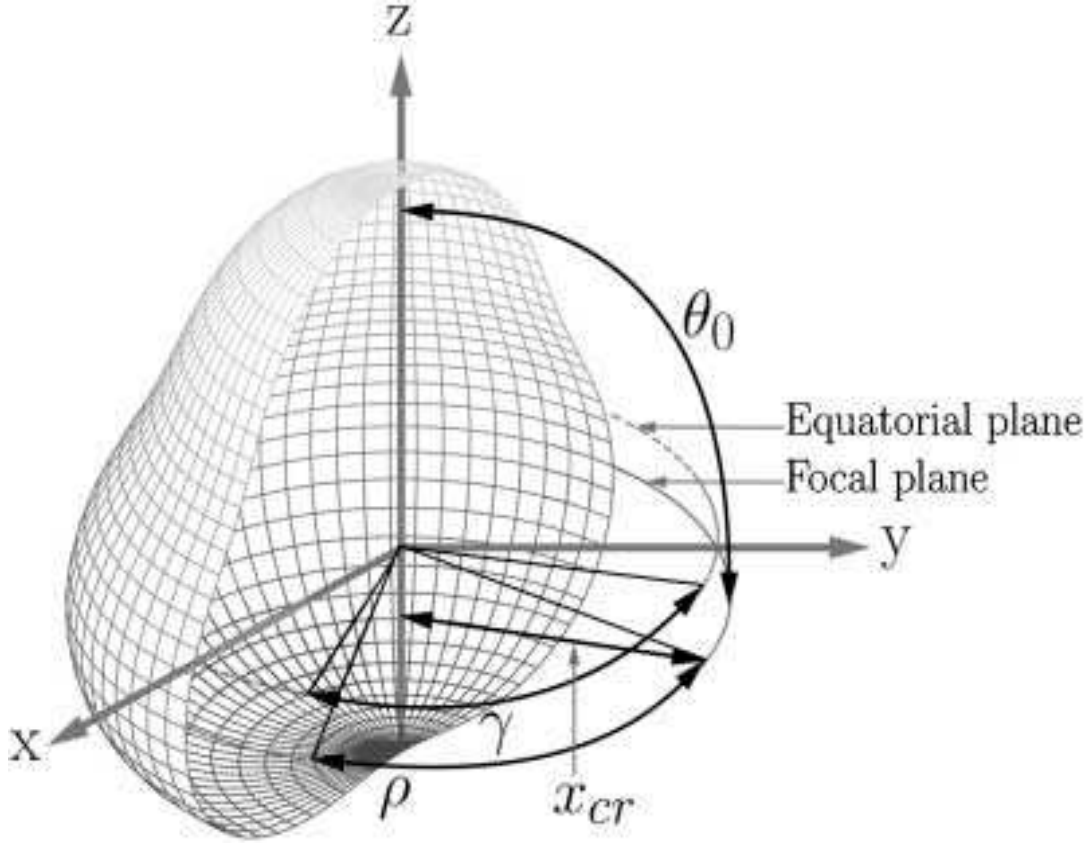


FIG. III.29 – *Simulation de la section d'une vésicule reposant sur une surface sous l'effet de la gravité (d'après [Henriksen and Ipsen, 2002]).*

effet est particulièrement important lorsqu'on s'intéresse à la forme des vésicules et donc aux valeurs des premiers modes [Döbereiner et al., 1997]. Expérimentalement et comme nous expliquions précédemment, nous avons limité la concentration en sucre afin de ne pas trop accentuer cet effet. Intuitivement on comprend que les vésicules de grand rayon sont plus déformées que les vésicules de faible rayon. Un calcul est proposé dans [Henriksen and Ipsen, 2002] dans le cadre de l'analyse des contours de la vésicule (purement lipidique) par les harmoniques sphériques. Nous supposons que nous pouvons nous placer dans ce cas. Les auteurs donnent le critère suivant pour déterminer les tailles pour lesquelles l'effet de la gravité est négligeable (la courbure spontanée est négligée ici) :

$$g_0 < \frac{25}{28}(12 + \Sigma) \quad (\text{III.3.24})$$

avec $g_0 = \Delta\rho g R^4 / \kappa$ et $\Sigma = \frac{\sigma R^2}{\kappa}$. Cette condition est équivalente à la condition suivante sur le rayon

$$R < R_{max} = \sqrt{\frac{\frac{25}{28} \frac{\sigma}{\kappa} + \sqrt{\left(\frac{25}{28} \frac{\sigma}{\kappa}\right)^2 + \frac{4\Delta\rho g}{\kappa} \frac{25}{28}}}{\frac{2\Delta\rho g}{\kappa}}} \quad (\text{III.3.25})$$

Dans le cas des vésicules que nous avons étudiées ici, nous avons les valeurs suivantes : le module de rigidité de courbure $\kappa \geq 6.4 \times 10^{-20} \text{ J}$, la tension $\sigma \geq 2 \times 10^{-8} \text{ J.m}^{-2}$. Pour les solutions que nous utilisons, on a $\Delta\rho = \rho_{in} - \rho_{out} = 1005.0 - 1002.0 = 3 \text{ kg/m}^3$ [Weast, 1988]. On obtient alors $R_{max} = 25 \mu\text{m}$. Or les vésicules que nous avons analysées ont des rayons compris entre 2.5 et $25 \mu\text{m}$; on peut donc négliger les effets de la gravité sur le spectre de fluctuation dans nos mesures.

B. Résultats

B.1 Mesures des rigidités de courbure

Le but de ces expériences sur les vésicules passives était de tester notre protocole expérimental sur des systèmes simples; ainsi nous avons mesuré le module de rigidité de courbure κ et la tension σ pour les compositions suivantes : EPC, SOPC, SOPC:Chol 1:1 (molaire), pour lesquels des mesures ont été déjà faites. Nous avons obtenu en séries de Fourier discrètes 20 à 25 modes exploitables (en général, pas au-delà du mode 30). On a bien sûr éliminé les premiers modes (voir § B.1.4 p. 115), car c'est sur eux que porte l'erreur due à la topologie fermée de la membrane et les derniers points car ils correspondent au *cross-over* avec la remontée à grands vecteur d'onde q_x . Ces points sont alors «fittés» comme explicité au-dessus. La qualité du fit est très bonne comme peut le montrer l'exemple III.30.

On suppose que la déviation standard sur le positionnement de chaque point est de 0.1 pixel (ceci correspond à la précision de notre méthode de détection des contours). Cela donne alors les barres d'erreurs indiquées à la figure III.30. On voit que pour les plus faibles vecteurs d'onde cette erreur est très faible et devient importante pour les grandes valeurs de q_x . La précision est d'autant plus grande que la taille de la vésicule est grande, ainsi nous avons choisi de préférence de gros objets.

Nous avons par ailleurs testé la reproductibilité de ces spectres en faisant l'acquisition de 2000 contours, puis attendant une dizaine de secondes avant de reprendre l'acquisition; cette séquence est répétée dix fois et les spectre obtenus sont superposables. Nous avons répété cette série de tests deux fois, l'une en éclairage jaune, l'autre en éclairage rouge afin de s'assurer que cela n'induisait pas de changement dans le spectre de fluctuations mesuré (voir fig. III.31 p. 176).

La gamme de vecteurs d'onde accessible reste limitée comme nous l'indiquions

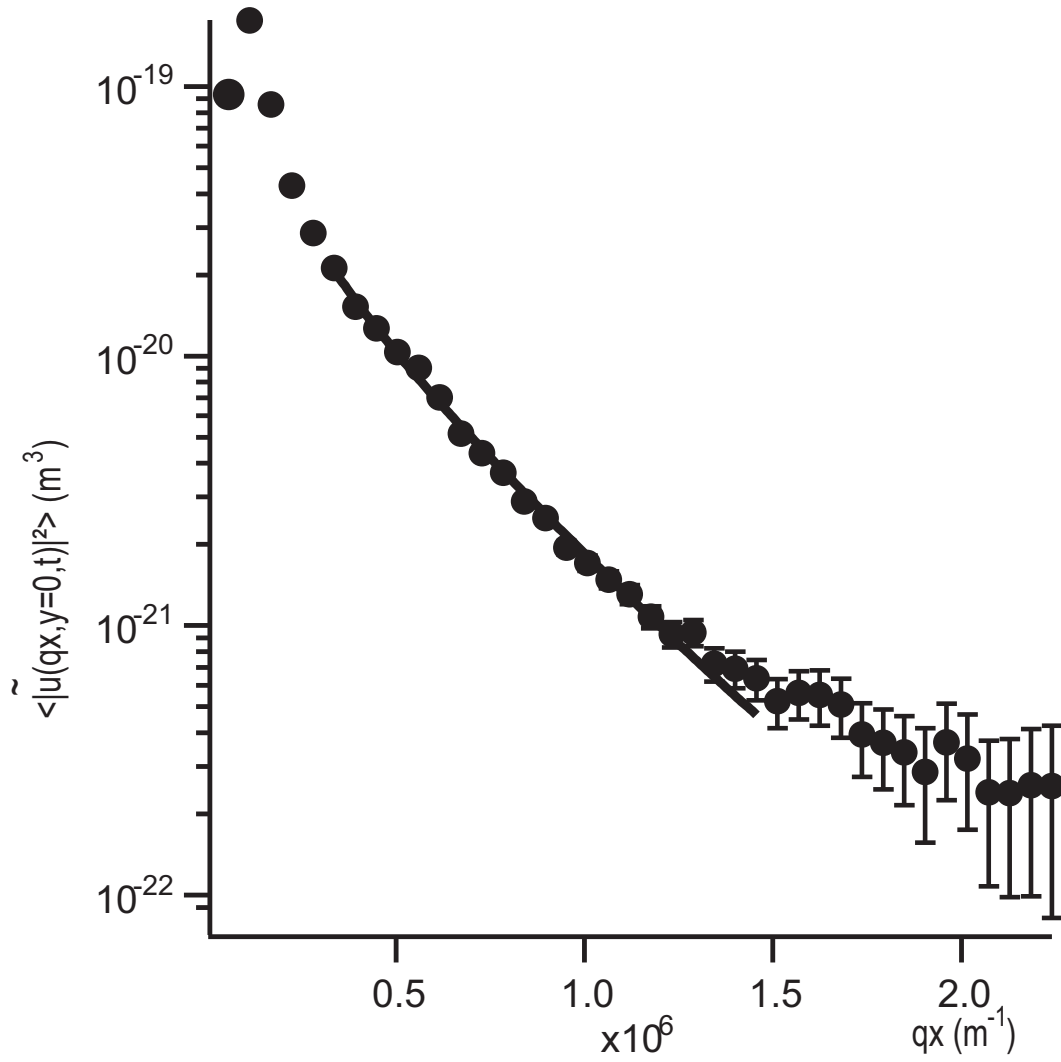


FIG. III.30 – Amplitudes de fluctuation $\langle |\bar{u}(q_x)|^2 \rangle$ en fonction du vecteur d'onde q_x pour une vésicule de SOPC. Les barres d'erreurs ont été calculées selon la méthode explicitée au § A.3.2 p. 171. Le trait plein correspond au «fit» des données avec l'expression corrigée en temps pour une section dans le plan équatorial; on trouve ici les valeurs $\sigma = 1.7 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ et $\kappa = 9.4 \times 10^{-20} \text{ J}$.

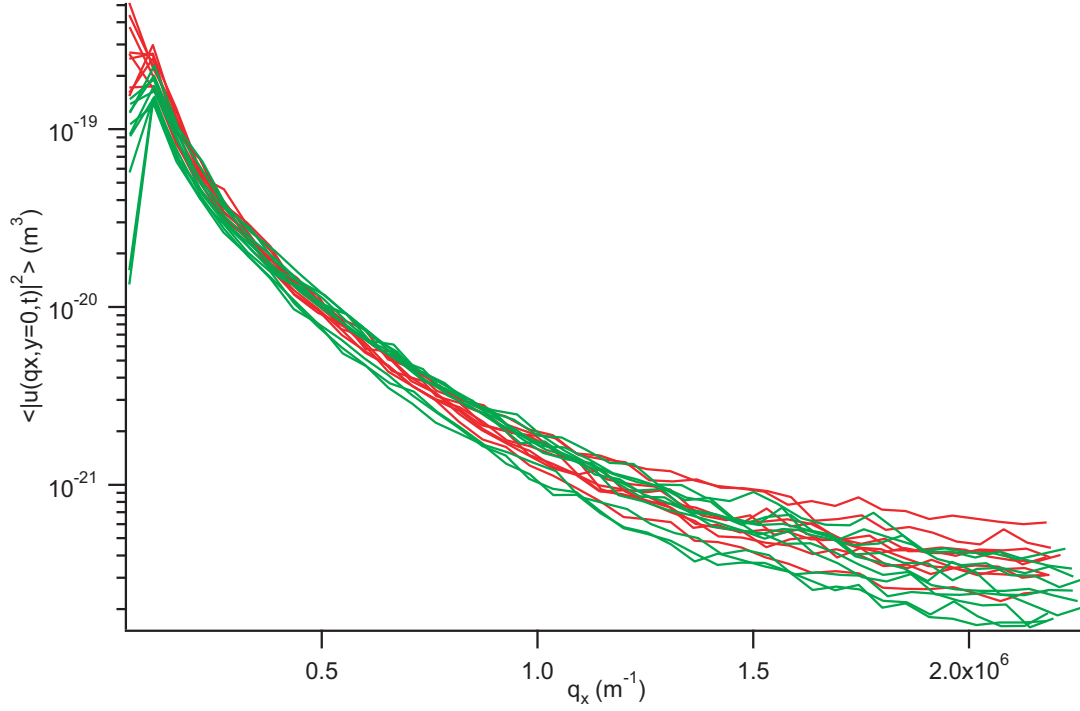


FIG. III.31 – Amplitudes de fluctuation $\langle |\bar{u}(q_x)|^2 \rangle$ en fonction du vecteur d'onde q_x pour une vésicule de SOPC. L'acquisition est répétée dans l'ordre dix fois en jaune (courbes vertes) puis dix fois en rouge (courbes rouges).

au § B.1.7 p. 120. Elle est limitée par le temps d'intégration de la caméra (les fluctuations doivent avoir un temps de vie du même ordre de grandeur ou supérieur au temps d'intégration de la caméra, pour que la correction calculée soit correcte); d'autre part, la remontée due à la précision finie sur la détection de l'amplitude est la seconde limite aux grands vecteurs d'onde. C'est cette dernière qui est le plus souvent limitante. En pratique notre technique permet de mesurer les spectres jusqu'à $4 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ (pour les vésicules les plus petites), donc d'accéder à des longueurs d'onde $\lambda = \frac{2\pi}{q_x} \geq 1.6 \mu\text{m}$.

Pour chaque vésicule, nous avons réalisé plusieurs séries de contour, à partir desquels nous avons «fitté» pour chacune une valeur du module de rigidité de courbure et de la tension. Si on suppose que l'on a pris M séries, et que les valeurs du module de rigidité de courbure sont indexées par i , soit κ^i avec une déviation standard sur cette valeur de σ_κ^i , alors on calcule le module de rigidité de courbure pour la vésicule $\bar{\kappa}$ selon la formule :

$$\bar{\kappa} = \frac{\sum_{i=1}^M \frac{\kappa^i}{(\sigma_\kappa^i)^2}}{\sum_{i=1}^M \frac{1}{(\sigma_\kappa^i)^2}} \quad (\text{III.3.26})$$

De cette manière les mesures qui comportent les plus grandes erreurs expérimentales contribuent moins. Ensuite on répète cette opération pour une dizaine de vésicules et on calcule la moyenne sur les vésicules, pondérée de la même manière. On en

Lipide	module de rigidité de courbure κ (10^{-20} J)	déviati on standard σ_κ (10^{-20} J)
EPC	4.25	0.87
SOPC	12.6	2.6
SOPC:CHOL	29.6	3.3

 TAB. III.1 – *Module de rigidité de courbure κ de EPC, SOPC, SOPC:CHOL(1:1)*

déduit finalement une valeur de κ pour chaque composition lipidique, ainsi qu’une barre d’erreur associée (voir tab. III.1).

Ces résultats apparaissent en bon accord avec les résultats précédemment trouvés par d’autres auteurs (voir tab. III.2) qui sont eux-mêmes assez dispersées.

Nous n’avons volontairement pas reproduit les barres d’erreurs sur les valeurs des divers auteurs car les méthodes de calcul diffèrent d’un cas à l’autre et en général sous-estiment les erreurs. En particulier notre évaluation prends en compte le bruit dû à la limite de sensibilité de la détection (voir § B.1.7 p. 120). Il n’est donc pas possible de comparer directement.

Par ailleurs, les tensions que nous avons mesurées varient d’une vésicule à l’autre et vont de 2×10^{-8} N/m à 10^{-6} N/m. Ces tensions restent tout à fait compatibles avec celles rapportées par d’autres auteurs en reconnaissance de contours [Häckl et al., 1997; Faucon et al., 1989]. Elles correspondent aux tensions les plus faibles accessibles par les expériences de micropipettes [Evans and Rawicz, 1990].

B.2 Conclusion

Les expériences que nous avons réalisées avec différentes membranes lipidiques montrent que la technique de détection des contours et les analyses que nous avons mises en place donnent des résultats tout à fait compatibles avec ce qui a été publié précédemment dans la littérature. Cependant, il faut noter plusieurs améliorations importantes que nous avons apportées par rapport aux travaux précédents :

- Même si les vésicules que nous avons étudiées étaient le plus souvent sphériques, notre analyse est utilisable pour des formes beaucoup plus générales de vésicules.
- Nous avons aussi montré que l’analyse utilisant une théorie développée pour des membranes planes reste valable pour des vésicules si on omet les tout premiers modes.
- Notre analyse n’est pas valable uniquement pour les premiers modes du spectre comme c’est le cas par exemple dans [Peterson et al., 1992; Faucon et al., 1989; Duwe et al., 1990; Döbereiner et al., 1997] mais nous pouvons exploiter le spectre sur au moins 20 modes.
- Par ailleurs la précision de l’expérience permet une réelle comparaison entre

Lipide	κ (10^{-20} J)	Technique	Ref.
EPC	10 – 20	fonctions de corrélations	[Schneider et al., 1984]
EPC	4 – 5	Analyse de contours de vésicules	[Faucon et al., 1989]
EPC	11.5	Analyse de contours de vésicules	[Duwe et al., 1990]
EPC	8	Analyse de contours	[Mutz and Helfrich, 1990]
EPC	2.5	Déformation sous champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]
EPC	6.6	Analyse de contours de vésicules	[Méléard et al., 1998]
SOPC	20	Tubes sur des vésicules	[Bo and Waugh, 1989]
SOPC	9	Micropipettes	[Evans and Rawicz, 1990]
SOPC	14.4	Analyse de contours de vésicules	[Häckl et al., 1997]
SOPC	12.7	Analyse de contours de vésicules	[Méléard et al., 1998]
SOPC	18.1	Analyse de contours de vésicules	[Gerbeaud, 1998]
SOPC	12.7	Analyse de contours de vésicules	[Döbereiner et al., 2003]
SOPC:CHOL (1:1)	24.6	Micropipettes	[Evans and Rawicz, 1990]
SOPC:POPS:CHOL (39.2:0.8:60)	36	Tubes sur des vésicules	[Song and Waugh, 1993]

TAB. III.2 – Modules de rigidité de courbure κ de EPC, SOPC, SOPC:CHOL(1:1) trouvés par d'autres auteurs.

les spectre expérimentaux et les formes théoriques correspondantes ; nous ne sommes pas restreints à déduire uniquement le module de rigidité de courbure comme pour [Engelhardt et al., 1985; Häckl et al., 1997; Bivas et al., 1987; Strey et al., 1995; Schneider et al., 1984].

La technique développée récemment par H.-G. Döbereiner couplant l'analyse des contours à la simulation numérique [Döbereiner et al., 2003] permet de mesurer la rigidité de courbure avec une meilleure précision qu'avec notre méthode, mais ne permet pas du tout la mesure d'un spectre de fluctuations.

Nous pouvons donc sur la base de ces expériences utiliser ces outils pour l'étude des membranes plus complexes, en particulier les membranes actives et comparer les spectres de fluctuations avec ce que propose la théorie.

Chapitre III.4

Mesures sur les vésicules

hors-équilibre



DANS UN PREMIER TEMPS, nous précisons les analyses développées spécifiquement pour le système de membrane active contenant des pompes, puis nous présenterons les résultats obtenus avec la bactériorhodopsine. Enfin nous verrons une autre application de notre algorithme pour l'étude de membranes mises hors-équilibre par un apport extérieur de lipides.

A. Membranes actives contenant une pompe

A.1 Spectre de fluctuations ; résultats attendus

A.1.1 Spectre de fluctuations du contour dans le plan diamétral

Le spectre de fluctuations pour une membrane plane représentée par une nappe à trois dimensions, avec les approximation provenant des expériences de micropipettes (voir A.3 p. 47, et eq. I.2.27 p. 48) est le suivant :

$$\langle u(\mathbf{q}_\perp, t) u(-\mathbf{q}_\perp, t) \rangle \simeq \frac{kT}{\sigma q_\perp^2 + \tilde{\kappa}^e q_\perp^4} + \frac{kT [\mathcal{P}_a^2 w^2 + \Xi \mathcal{P}_a w]}{\chi(\sigma + \tilde{\kappa} q_\perp^2)(\sigma + \tilde{\kappa}^e q_\perp^2)} \quad (\text{III.4.1})$$

Lorsqu'on passe à un contour pris dans le plan diamétral de la vésicule on obtient par la méthode explicitée au § B.1.5 p. 117 le spectre :

$$\begin{aligned} \langle |u(q_x, y=0, t)|^2 \rangle &= \frac{kT}{2\sigma} \left[\frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right] \\ &+ \frac{kT(P_a^2 w^2 + \Xi P_a w)}{\chi \tilde{\kappa} \tilde{\kappa}^e} \left[-\frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\tilde{\kappa}^e} + q_x^2}} + \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\tilde{\kappa}} + q_x^2}} \right] \pi \left(\frac{\sigma}{\tilde{\kappa}^e} - \frac{\sigma}{\tilde{\kappa}} \right)^{-1} \end{aligned} \quad (\text{III.4.2})$$

Des simulations permettent de prévoir les résultats que nous attendons et sont présentées dans les trois figures III.32, III.33, et III.34 p. 184, avec les ordres de grandeurs présentés précédemment au § A.3 p. 47, et déduits des expériences de micropipettes. Dans cette simulation l'effet d'intégration en temps n'est pas pris en compte.

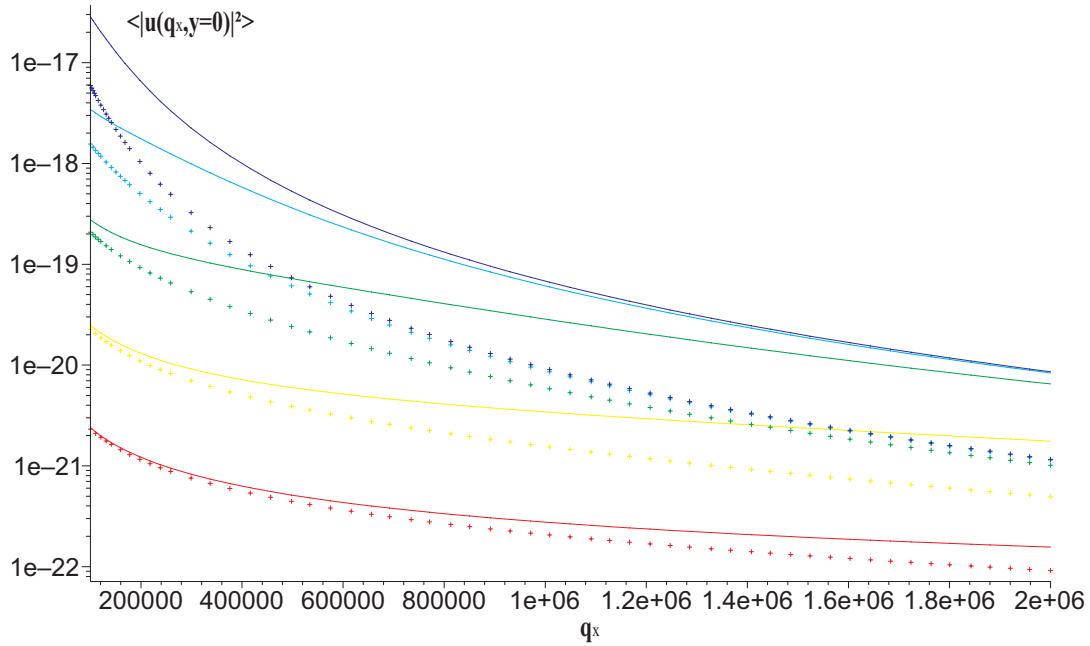


FIG. III.32 – Effet de la tension sur les spectres de fluctuations d'une vésicule active (ligne) et d'une vésicule passive (points). La tension varie de $\sigma = 10^{-9} \text{ N/m}$ (bleues marine), $\sigma = 10^{-8} \text{ N/m}$ (bleues ciel), $\sigma = 10^{-7} \text{ N/m}$ (vertes), $\sigma = 10^{-6} \text{ N/m}$ (jaunes), et $\sigma = 10^{-5} \text{ N/m}$ (rouges). Les autres paramètres ont été fixés avec les estimations du § A.3 p. 47. La taille caractéristique du dipôle de force hydrodynamique $w = 5 \times 10^{-9} \text{ m}$, le module de rigidité de courbure $\kappa = 4 \times 10^{-20} \text{ J}$, la concentration surfacique de protéines $\rho = 10^{16} \text{ m}^{-2}$, et la valeur du dipôle de force $P_a = 4 \times 10^{-20} \text{ J.m}$.

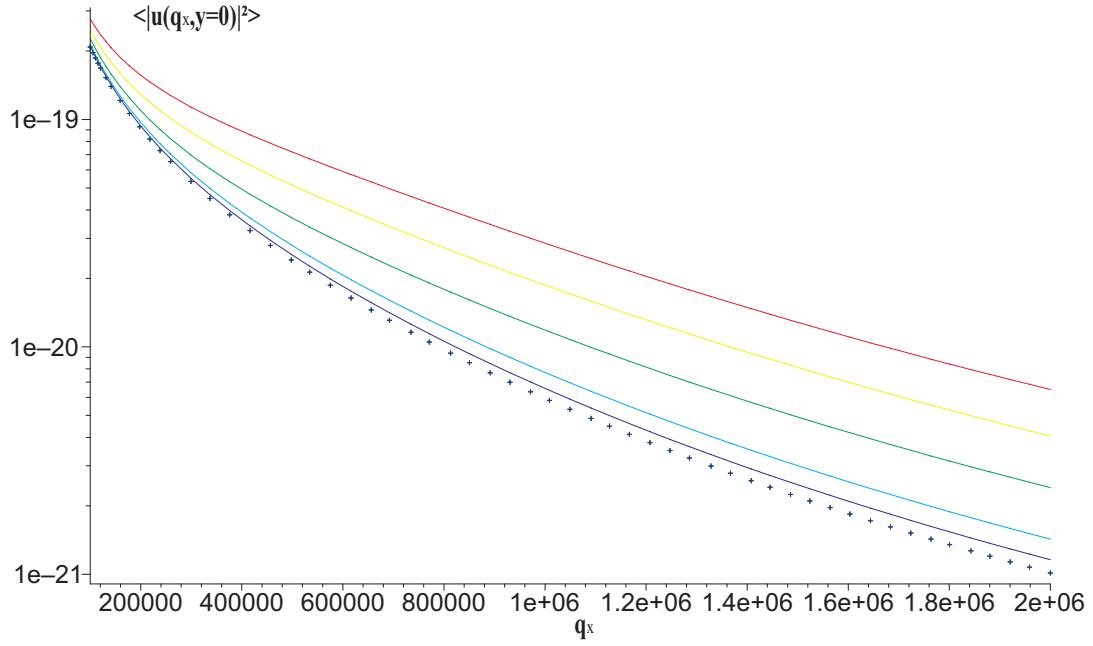


FIG. III.33 – *Effet du dipôle de force sur le spectre de fluctuations pour une vésicule active (ligne) et une vésicule passive (points). Le dipôle de force varie de $P_a = 0.5 \times 10^{-20} J.m$ (bleues marine), $P_a = 1 \times 10^{-20} J.m$ (bleues ciel), $P_a = 2 \times 10^{-20} J.m$ (vertes), $P_a = 3 \times 10^{-20} J.m$ (jaunes), et $P_a = 4 \times 10^{-20} J.m$ (rouges). Les autres paramètres ont été fixés comme à la figure précédente : $w = 5 \times 10^{-9} m$, $\kappa = 4 \times 10^{-20} J$, $\rho = 10^{16} m^{-2}$, $\sigma = 10^{-7} N/m$.*

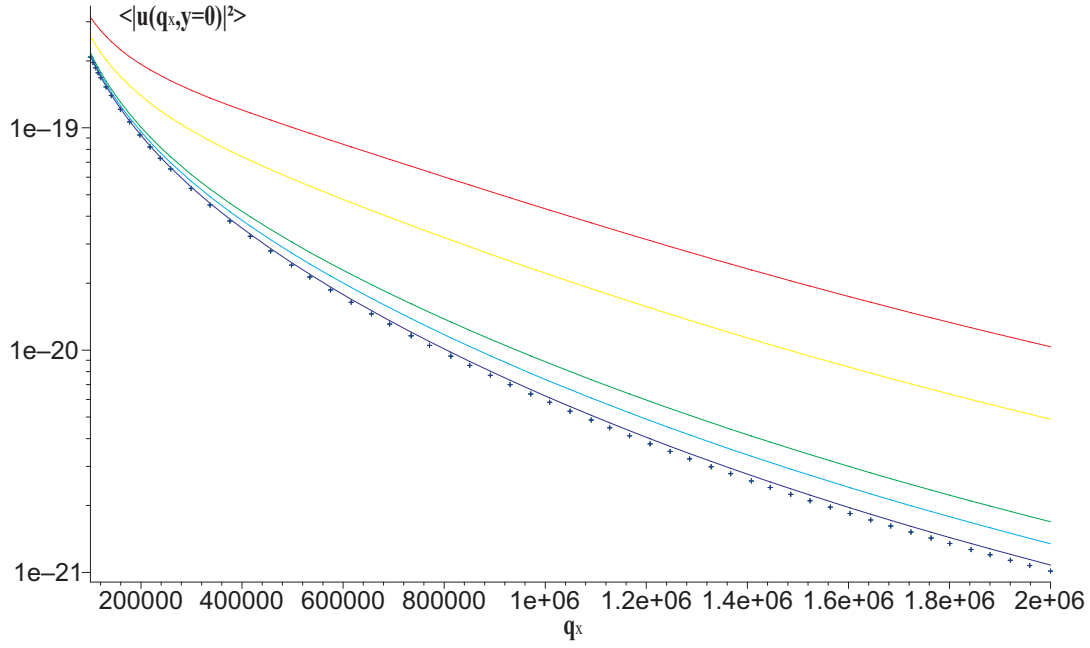


FIG. III.34 – *Effet de la concentration en protéines sur le spectre de fluctuation pour une vésicule active (ligne) et une vésicule passive (points). La concentration surfacique de protéine varie de $\rho = 1.5 \times 10^{14} m^{-2}$ (bleues marine), $\rho = 7.5 \times 10^{14} m^{-2}$ (bleues ciel), $\rho = 15 \times 10^{14} m^{-2}$ (vertes), $\rho = 75 \times 10^{14} m^{-2}$ (jaunes), et $\rho = 150 \times 10^{14} m^{-2}$ (rouges). Les autres paramètres ont été fixés comme aux deux figures précédentes : $w = 5 \times 10^{-9} m$, $\kappa = 4 \times 10^{-20} J$, $\rho = 10^{16} m^{-2}$, $\sigma = 10^{-7} N/m$, $\mathcal{P}_a = 4 \times 10^{-20} J.m$.*

On voit que si les paramètres déduits des expériences de micropipettes sont corrects, on s'attend à voir des effets amenant une différence détectable entre les spectres des vésicules passives et actives aux tensions généralement accessibles à nos expériences ($10^{-6} - 10^{-8}$ N/m). De plus ces spectres sont très sensibles à la valeur du dipôle de force (fig. III.33 p. 183) et à la concentration en protéines (fig. III.34).

Il apparaît donc raisonnable de s'attendre à observer des effets sur les spectres que nous obtenons en reconnaissance de contours si les paramètres sont tels que donnés par les expériences de micropipettes voire légèrement plus faibles.

A.1.2 Prise en compte de l'intégration en temps

Néanmoins comme nous l'indiquons au § B.1.6 p. 119, il faut prendre en compte l'intégration en temps. Si τ est le temps d'intégration de la caméra, d'après les calculs de D. Lacoste [Lacoste, 2004] on a :

$$\begin{aligned} \langle \bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t) \bar{u}(-\mathbf{q}_\perp, t) \rangle = & \frac{\langle \mu^2 \rangle}{2AB(\omega_1 - \omega_2)} [(A\omega_1 - \omega_\psi^2 \omega_2)h(\omega_1) - (A\omega_2 - \omega_\psi^2 \omega_1)h(\omega_2)] \\ & + \frac{\beta^2 \langle \nu^2 \rangle}{2AB(\omega_1 - \omega_2)} [\omega_1 h(\omega_2) - \omega_2 h(\omega_1)] \end{aligned} \quad (\text{III.4.3})$$

Avec le facteur correctif suivant

$$h(\omega) = \frac{2}{\tau^2 \omega} (\tau \omega + \exp(-\tau \omega) - 1) \quad (\text{III.4.4})$$

et avec les notations définies au § A.2.2 p. 45 et A.2.3 p. 46. Cette équation doit encore être intégrée sur q_y en espace pour prendre en compte le fait que nous n'observons qu'une coupe de la vésicule dans son plan diamétral. On attend alors des courbes ayant la forme suivante, où l'intégrale sera calculée numériquement :

$$\langle \bar{u}(q_x, y = 0, t) \bar{u}(-q_x, y = 0, t) \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \langle \bar{u}(\mathbf{q}_\perp, t) \bar{u}(-\mathbf{q}_\perp, t) \rangle \quad (\text{III.4.5})$$

A.2 Compléments sur le protocole de préparation

A.2.1 Solutions utilisées

Les vésicules actives sont électroformées dans une solution contenant du tampon MOPS à 1 mM ramené à $pH = 7.1$ avec de la soude, du KCl à 2mM, et du sucrose à 50 mM. Les vésicules sont transférées dans une solution de Glucose 52 mM contenant également du MOPS à 1 mM ramené à $pH = 7.1$ avec de la soude, et du KCl à 3 mM. Le compromis entre les effets de la gravité et le contraste d'indice nécessaire s'est posé comme dans le cas des vésicules passives et a été résolu de la même manière.

Pour la suite, on supposera que le critère de Henriksen et al. [Henriksen and Ipsen, 2002] reste valable dans le cas des vésicules actives ; en effet l'activité ne paraît pas a priori devoir modifier les effets de la gravité. Ainsi les concentrations en sucre des solutions étant sensiblement les mêmes, on gardera le même rayon limite de $25 \mu\text{m}$

que pour les vésicules passives afin de pouvoir négliger les effets de la gravité.

Les solutions seront systématiquement filtrées (à $0.2\mu\text{m}$) au moment de leur utilisation afin d'éviter la présence de poussières et surtout de bactéries.

A.2.2 Éclairage de la préparation

La bactériorhodopsine se présente dans l'obscurité sous sa forme *dark-adapted*. Il est donc nécessaire de l'éclairer en jaune avant les expériences pour l'amener dans la configuration *light-adapted* ; néanmoins cette transition est rapide, de l'ordre de la minute tandis que le retour complet vers la configuration *dark-adapted* prend plusieurs heures. Par contre il ressort des expériences d'activité faites avec la pyranine que au bout de typiquement 10 minutes de pompage, il y a un phénomène de saturation dû à l'apparition d'un potentiel transmembranaire qui inhibe le pompage par la protéine. Ainsi au bout d'une à quelques dizaines de minutes, la protéine ne pompe plus car le potentiel transmembranaire est trop élevé et inhibe son action. Ce potentiel relaxe complètement en une à quelques dizaines de minutes en l'absence de pompage par perméation des protons à travers la bicouche. La valeur des temps caractéristiques de saturation et relaxation vont dépendre directement de l'asymétrie de l'incorporation de la protéine dans la vésicule étudiée : plus l'asymétrie sera grande, plus la saturation arrivera rapidement, et plus la relaxation totale pourra être longue. C'est pourquoi le transfert (durée, d'un quart d'heure environ) et la recherche des vésicules (durée, quelques minutes) se feront en éclairage rouge. La BR conserve dans ces conditions sa conformation *light-adapted* [Kouyama et al., 1985] tout en ne développant pas de potentiel transmembranaire (ou en permettant la relaxation d'un potentiel transmembranaire dû à l'acquisition précédemment d'une autre vésicule). Lors des expériences nous commencerons par faire l'acquisition d'une série de contours rouge (passif) ; ensuite seulement, nous passerons en éclairage jaune (actif) et nous prendrons les 5 premières minutes comme période active. Une série de contours sera donc acquise durant cette période. Au delà, nous estimerons que le pompage est trop ralenti pour permettre une observation de l'activité. Nous repasserons donc en rouge quelques minutes pour laisser relaxer le gradient avant une autre acquisition en jaune. Couramment le cycle acquisition en rouge puis acquisition en jaune est répété deux fois sur chaque vésicule.

A.2.3 Obtention de vésicules fluctuantes

Une des difficultés a été l'obtention de vésicules fluctuantes pour permettre l'étude de fluctuations à l'échelle optique. Nous avons fait des tests dans un premier temps en modifiant la pression osmotique de la solution de glucose. Des osmolarités entre 50 et 52 mM ne rendent pas les vésicules suffisamment détendues pour permettre l'études des fluctuations optiques (qui restent trop faibles en amplitudes) ; par contre des osmolarité plus forte de la solution de glucose amène à une phase transitoire d'une dizaine de minutes après transfert des vésicules où celles-ci fluctuent puis relaxent leur excès de surface dans des structure en forme de filaments ou de points noirs attachés à la membrane. Après quoi la tension des vésicules devient de nouveau trop

grande pour permettre notre étude. Ceci peut être rapproché des travaux effectués dans le groupe par J. Solon qui montre qu'une vésicule déstabilisée par un excès d'aire trop important voit sa bicouche «collapser» et des îlots se forment sur la bicouche. Pendant cette transition la tension de la bicouche augmente de nouveau vers une tension d'équilibre. Nous avons donc laissé notre chambre d'observation ouverte sur un côté afin de permettre une évaporation lente qui va faire croître progressivement la pression osmotique de la solution extérieure de glucose. Les vésicules se mettent à fluctuer et relaxent lentement leur excès de surface dans des structures comme ci-dessus. Si on ferme la chambre à ce stade, alors les vésicules se retendent et deviennent non fluctuantes à l'échelle des longueurs d'onde optiques. Nous laisserons donc la chambre ouverte, ce qui nous met au bout d'une heure environ dans une configuration où la tension des vésicules est suffisamment basse et ne varie que lentement à l'échelle de nos acquisitions, par compensation des deux effets explicités ci-dessus.

A.3 Méthode complémentaire d'analyse des résultats

A.3.1 Calcul des erreurs

Les calculs sont similaires à ceux des vésicules passives (voir § A.3.2 p. 171) à l'exception du fait que f est la fonction définie à l'eq. III.4.3 p. 185. Les calculs sont effectués numériquement de manière identique.

A.3.2 Résultat brut, introduction d'une correction du bruit

Nous avons effectué les mesures sur les vésicules actives. Nous avons obtenu des spectres comme celui reproduit figure III.35. On remarque tout d'abord que les spectres ne sont pas superposables, même les spectres rouges entre eux. On peut noter ensuite que la partie exploitable du spectre est relativement limitée par le bruit venant de la détection discrète et discuté au § B.1.7 p. 120. Pour pouvoir étendre plus loin aux grands q_x la comparaison des spectres, nous avons alors décidé de soustraire la contribution de ce bruit au signal brut pour obtenir des spectres corrigés du bruit. En effet nous avons développé le formalisme de calcul des erreurs permettant un calcul précis de la variance sur le module du coefficient complexe de Fourier c_n .

En pratique on utilise le calcul d'erreurs que nous avons fait et plus particulièrement la variance de c_n . On sait que dans ce terme se trouve en facteur σ^2 qui caractérise la résolution de notre détection. Nous allons en faire un paramètre ajustable, car la détection se fait au mieux à une résolution de 0.1 pixel mais cette résolution peut être plus faible. Pour déterminer ce paramètre, nous calculons le spectre de fluctuation sur 80 modes. Au niveau du mode 80, le signal brut est uniquement dû au bruit, et les fluctuations ne contribuent pas. Nous allons donc ajuster à l'aide de la valeur de ce mode le paramètre σ . Il est à noter que le bruit ainsi calculé coïncide très bien avec la remontée (voir fig. III.36).

Ces spectres corrigés sont exploitables pour des vecteurs d'onde tels que le bruit

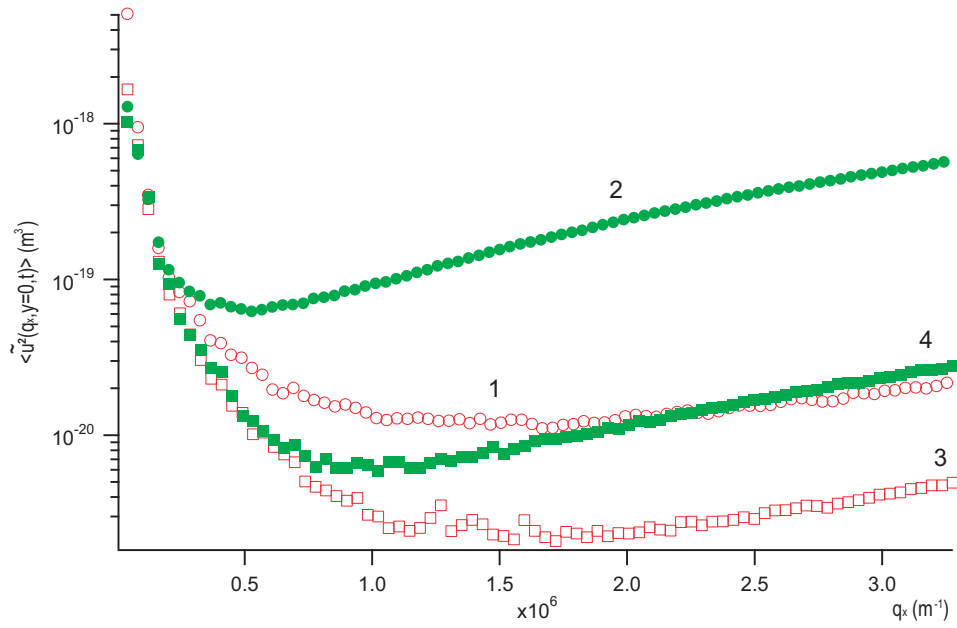


FIG. III.35 – Spectre de fluctuations brut obtenu pour un protéoliposomes contenant de la BR. Dans un premier temps nous avons acquis (1) 5000 contours en éclairage rouge (protéine passive) (cercles rouges), (2) puis autant en éclairage jaune (disques verts), (3) puis à nouveau autant de contours en rouge (carrés creux rouges) et enfin (4) 5000 contours en éclairage jaune (carrés pleins verts).

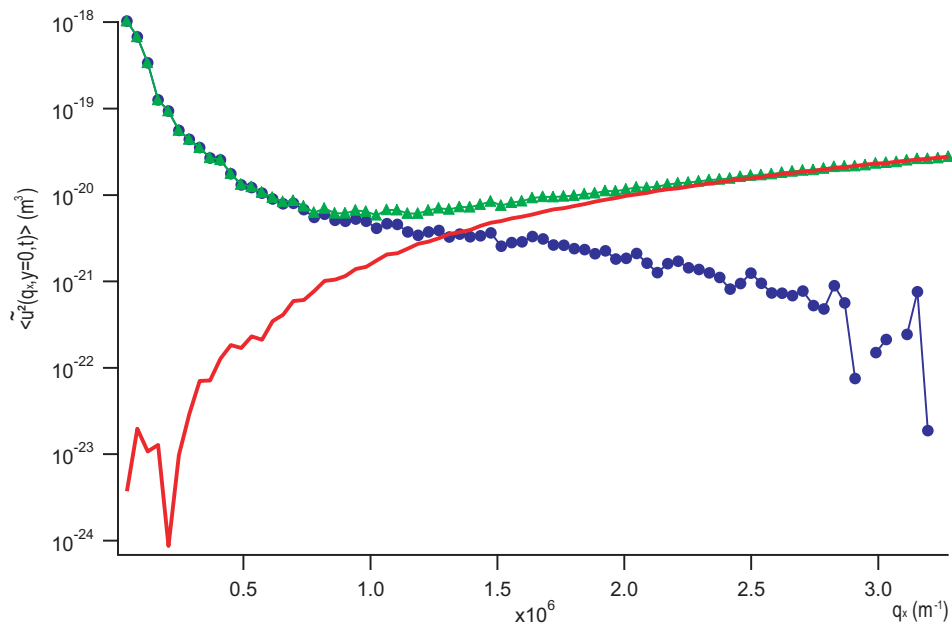


FIG. III.36 – Spectre de fluctuations brut (triangles verts), corrigé (ronds bleus) et bruit (ligne rouge) obtenu pour un protéoliposomes contenant de la un rapport 7 poids/poids de SOPC/BR. Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours sur un protéoliposomes éclairé en jaune.

est inférieur au signal brut, soit pour des vecteurs d'onde où le spectre brut décroît (début de la courbe) ou est sensiblement constant (partie suivante, avant que la remontée du spectre brut) (région du *cross-over* avec le bruit); en effet, au delà, le signal brut comporte essentiellement la contribution du bruit et la résolution ne permet pas de déterminer le signal, alors beaucoup plus petit qui s'y rajoute. On peut donc étendu la zone exploitable du spectre.

Sur la courbe III.37 on peut «fitter» la courbe corrigée jusqu'à $q_x = 1.1 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$. Pour tester la validité de cette correction nous l'avons appliquée aux spectres passifs précédemment obtenus pour déterminer si on trouve bien que les paramètres déduits du fit de la courbe sont corrects. C'est ce que nous avons fait sur la population de vésicules purement lipidiques étudiées précédemment. La figure III.37 donne un exemple de cette vérification. On voit que le *fit* peut s'étendre jusqu'à des valeurs de q_x supérieures avec la correction (avant la limite en q_x était $0.5 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ et après $1.1 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$) Nous avons retrouvé les valeurs standard des modules de rigidité de

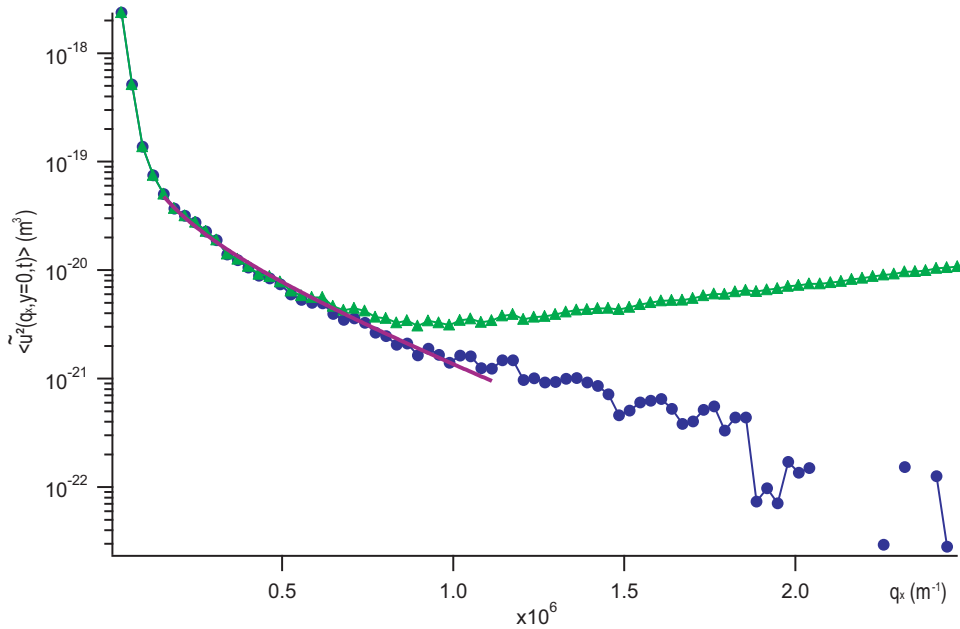


FIG. III.37 – Spectre de fluctuations brut (triangles verts), et corrigé (ronds bleus) pour une vésicule de SOPC. Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours. Le fit de la courbe corrigé donne des valeurs tout à fait acceptable pour SOPC, une tension $\sigma = 2 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ et un module de rigidité de courbure de $\kappa = 12.8 \times 10^{-20} \text{ J}$.

courbure précédemment mesurés. Ceci valide la correction que nous avons introduite.

A.4 Résultats

L'ensemble des résultats présentés ici sont obtenus après la correction mentionnée ci-dessus. Par ailleurs dans le but de maximiser les effets, nous avons utilisé le rapport protéine sur lipide le plus important que nous pouvions faire soit 1/7 en poids, soit 1/231 molaire. Nous avons vérifié que la protéine été bien présente par microscopie

confocale, à l'aide du marquage FITC de la protéine (voir fig III.38).

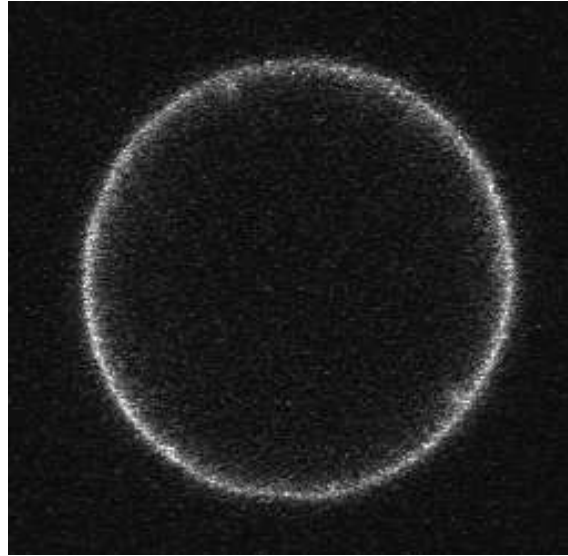


FIG. III.38 – *Image en microscopie confocale d'une vésicule venant de la préparation utilisée pour les expériences sur les membranes actives. La protéine est marquée à l'aide de FITC.*

Deux idées maîtresses ressortent de ces résultats :

- Contrairement à ce que nous attendions, le simple spectre des membranes passives avec de la BR ne se superposent pas du tout à celui de la membrane de SOPC pur. La présence de la protéine le modifie clairement ;
- On ne peut pas «fitter» les spectres tant dans le cas de la protéine passive que dans le cas de la protéine active avec les expressions respectivement des spectres pour les membranes à l'équilibre et pour les membranes actives.

Nous allons détailler nos résultats et proposer des hypothèses pour les comprendre.

A.4.1 Effet de la présence des protéines

Les spectres obtenus pour des membranes contenant la protéine passive semblent fortement modifiés par rapport au spectre de membrane purement lipidiques, même dans le cas où on a maintenu un éclairage en rouge depuis suffisamment longtemps pour que tout gradient de protons ait eu le temps de relaxer. C'est le cas par exemple de la figure III.39 Le début de courbe s'il est «fitté» par un spectre passif (eq. III.3.9 p. 170) va donner une valeur de tension tout à fait pertinente pour ce type d'expériences, par contre si on va plus loin vers les grands q_x et que l'on essaye de déterminer une valeur du module de rigidité de courbure, tout se passe comme si celui-ci était très faible (inférieur à kT), ou comme si la tension de la membrane diminuait lorsque q augmente, c'est à dire que la tension de la membrane paraîtrait

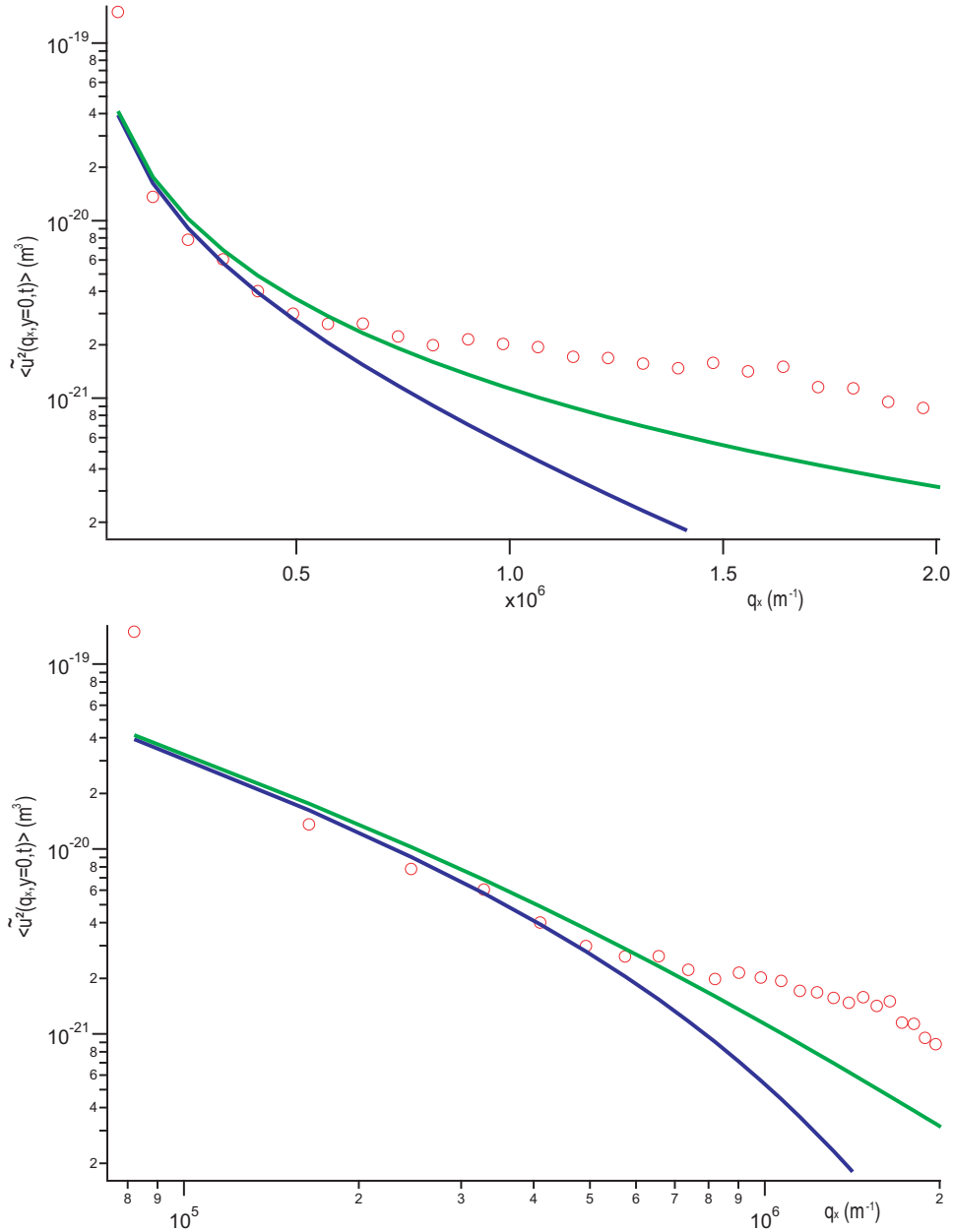


FIG. III.39 – Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine, éclairée en rouge et ayant complètement relaxé le gradient de protons. Les points violets représente la mesure expérimentale, tandis que la ligne bleue représente le spectre attendu pour une vésicule de même tension ($\sigma = 3.1 \times 10^{-7} \text{ N/m}$) et de module de rigidité de courbure $\kappa = 11 \times 10^{-20} \text{ J}$, valeur classique pour SOPC. On note que la courbe expérimentale s'écarte notablement de la courbe pour une simple vésicule passive. Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours.

d'autant plus faible que l'on regarde des longueurs d'onde courtes. On peut voir sur la courbe III.39 que le spectre obtenu s'écarte très vite de celui attendu pour une vésicule de même tension, et où la rigidité de courbure serait la même que SOPC (ce qui correspond aux observations de J.-B. Manneville).

La théorie des membranes actives modélise la protéine dans la membrane comme un gaz parfait de protéines dans la membrane (notamment dans l'hypothèse $\chi = \frac{kT}{\rho}$). Or nous sommes à une concentration élevée de protéines puisque nous avons 1 protéine pour 231 lipides soit en surface, pour une protéine faisant 8.75 nm^2 et un lipide 0.5 nm^2 , une proportion de 13 % de la membrane couverte par les protéines. La distance moyenne entre chaque protéine est de 7.6 nm. Cette forte correction pourrait expliquer un écart avec la théorie. Néanmoins J.-B. Manneville travaillait avec des concentrations élevées a priori et n'avait pas mesuré d'effet (dans l'EPC et non le SOPC). On pourrait aussi évoquer le fait que la bactériorhodopsine porte deux charges négative au pH où nous travaillons. Cependant on a vu qu'on s'attendait alors à une augmentation du module de rigidité de courbure, donc l'effet opposé à celui observé.

A.4.2 Effet du gradient électrochimique et/ou du potentiel transmembranaire.

Une second observation est que les spectres rouges pris juste après une séquence où la BR est active sont plus bas que les spectres acquis après un temps d'attente assez long pour laisser relaxer le gradient de protons^a (voir fig. III.40). Notre hypothèse est ici que les protons pompés par la protéine créent un potentiel transmembranaire. Ces phénomènes ont certainement un rôle dans le spectre de fluctuations, mais nous n'avons pas de support théorique pour décrire l'effet attendu. Les observations semblent indiquer que ce gradient de charge vient diminuer l'amplitude des fluctuations aux grands vecteurs d'onde. Toutefois là aussi des expériences complémentaires et notamment des expériences avec un transporteur de proton comme la carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) qui empêcherait la formation du gradient, permettrait de distinguer si l'effet est bien du à ce gradient [Seigneuret and Rigaud, 1986]. De plus, un autre effet signalé dans la littérature est l'agrégation des BR sous l'effet de leur activité [Kahya et al., 2002] ; nous mesurons peut-être simplement deux spectres qui diffèrent par les interactions entre protéines car elles seraient dans le second cas plus agrégées que dans le premier.

A.4.3 Effet de l'activité de la Bactériorhodopsine

L'effet du pompage de la protéine n'est pas toujours le même. En effet nous observons des cas où le spectre pris en éclairage en jaune, donc avec la protéine active,

a. Les expériences faites avec la pyranine en GUV nous ont montré que les temps caractéristiques pour arriver au gradient maximal que la protéine peut créer ou à une relaxation du gradient sont de l'ordre de la dizaine de minutes.

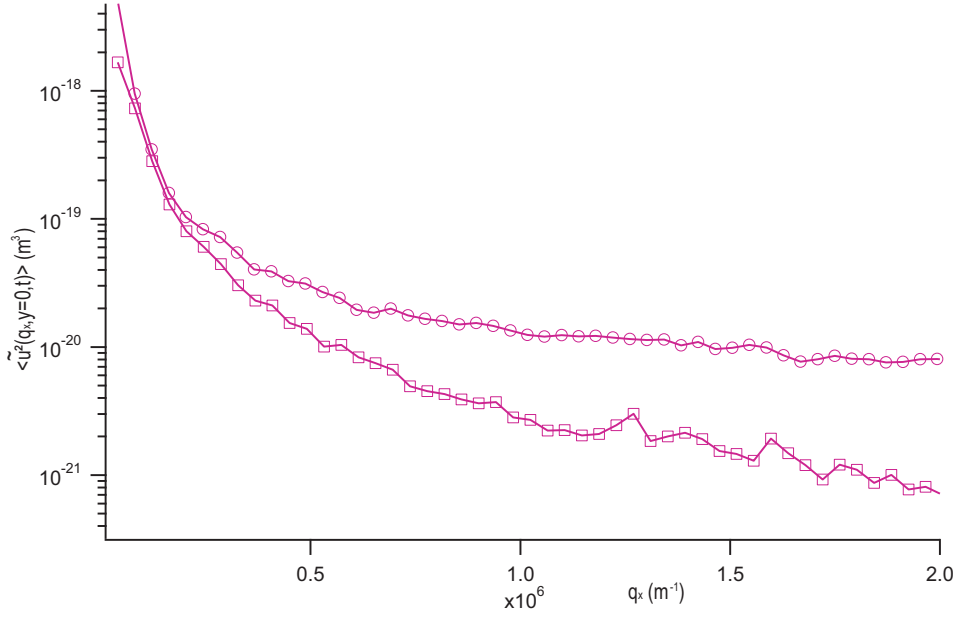


FIG. III.40 – Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et ayant relaxé le gradient de protons (cercles violets), et ensuite juste après un éclairage de 4 minutes en jaune (carrés violet). Il s’agit de l’acquisition de 5000 contours.

est au dessus du spectre acquis juste avant en rouge, donc en l’absence d’activité, sur la même vésicule ; c’est ce que nous attendions expérimentalement. Cependant dans d’autres cas les spectres sont superposés, et enfin des cas inverses où la courbe prise en éclairage en jaune est en-dessous de la courbe prise juste avant en éclairage en rouge. Notre hypothèse est qu’il y a concurrence entre l’effet de l’activité qui augmente les fluctuations, à une longueur d’onde donnée, et l’effet de la présence de charges dans la vésicule et/ou d’un potentiel transmembranaire qui aurait l’effet inverse. L’effet résultant dépendrait alors de la dissymétrie effective de l’orientation de la BR dans la vésicule observée. C’est cette hypothèse qui va être testée.

Cas d’une incorporation très proche de la symétrie Pour une certaine proportion de vésicules, il est possible qu’il y ait quasiment la même quantité de BR qui pompent dans un sens que dans l’autre. Le gradient de protons se développe alors lentement et est moins élevé sur la durée d’une acquisition (si on suppose que la fuite des protons par perméation se fait de la même manière dans toutes les vésicules). Donc l’effet dominant n’est pas celui du gradient de protons produit par le pompage mais celui de l’activité. Toutefois lors de la première acquisition en jaune on observera un décalage entre la courbe en éclairage en rouge et la courbe en éclairage en jaune plus important, que si on répète le cycle d’acquisition rouge/jaune juste après. De plus si on suppose que le gradient se développe au fur et à mesure de l’expérience, la deuxième acquisition en rouge doit donner des valeurs plus basses que la première. C’est bien ce qu’on retrouve dans les courbes reproduites figure III.41. Il est à noter que pour observer ces effets la vésicules doit avoir eu le temps de relaxer un gradient

de protons précédemment acquis avant les mesures.

A titre indicatif, nous avons tracé le spectre attendu pour la membrane active

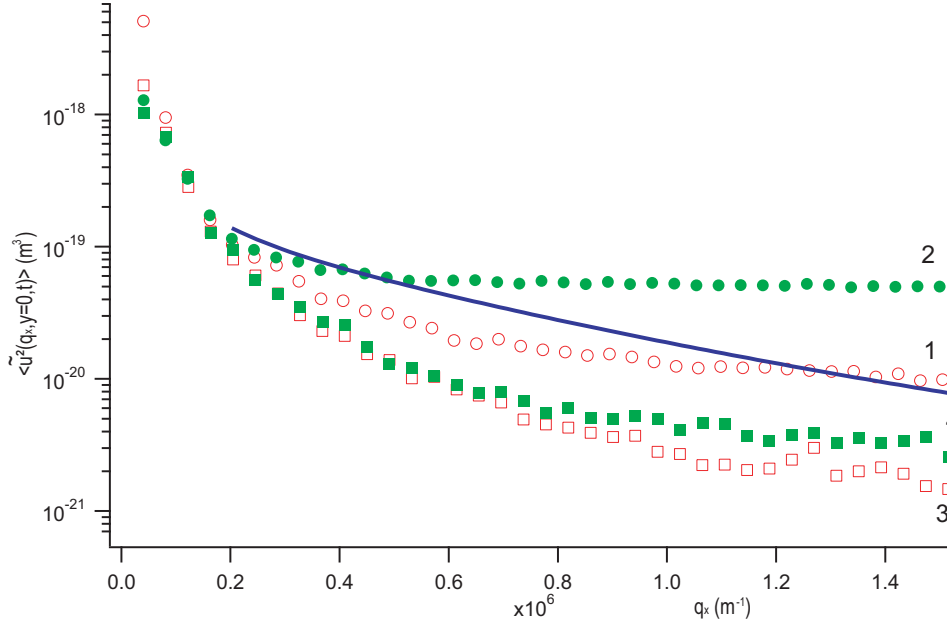


FIG. III.41 – Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). La ligne bleu représente le spectre attendu avec les paramètres déduits des expériences de micropipettes (notamment $\mathcal{P}_a = 4 \times 10^{-20} \text{ J.m}$, une tension ajustée pour «fitter» au mieux la courbe $\sigma = 8.9 \times 10^{-8} \text{ N/m}$, et la densité de nos expériences $\rho = 1.5 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$) sans la prise en compte de l'intégration en temps (eq. III.4.2 p. 182). Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours à chaque fois. D'après les hypothèse que nous avons faites au § A.4.3 p. 192, l'incorporation des protéines serait quasi symétrique pour cette vésicule.

avec le dipôle hydrodynamique actif $\mathcal{P}_a = 4 \times 10^{-20} \text{ J.m}$ mesuré par J.-B. Manneville, la tension comme paramètre ajustable pour se rapprocher au plus de la courbe expérimentale, et une concentration $\rho = 1.5 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$ qui correspond à nos expériences. Nous n'avons pas inclus l'intégration en temps qui tendrait à encore «abaisser» la partie de la courbe aux grands q_x . On voit que la courbe expérimentale est bien au-dessus de cette courbe théorique. Nous ne pouvons donc pas raisonnablement comprendre nos spectre avec l'expression proposée eq. III.4.2 p. 182 (voir fig. III.42).

Cas d'une incorporation très légèrement éloignée de la symétrie Si l'asymétrie d'orientation des protéines est un peu plus poussée, au cours des quatre minutes de chaque acquisition, un gradient de charges non négligeable a le temps de se constituer pendant les acquisitions en jaune, ce qui tendrait en plus à réduire

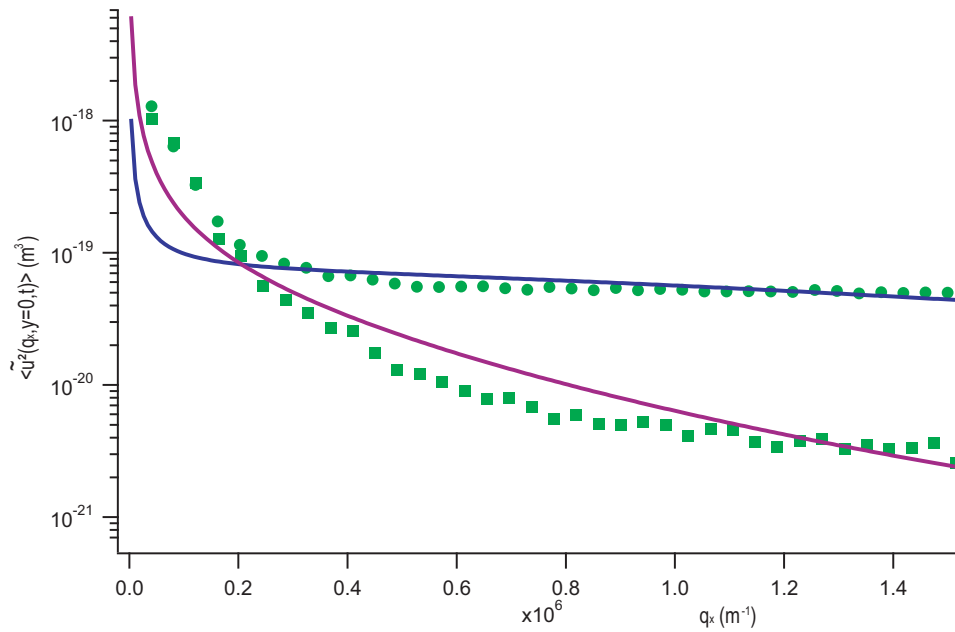


FIG. III.42 – Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (non représenté), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (non représenté) et enfin en jaune (carrés pleins verts). Il s'agit de la même vésicule qu'à la figure III.41. On a placé les courbes théoriques du spectre actif «fittant» au mieux les courbes expérimentales sur la tension et le dipôle de force. La courbe bleue est pour une tension $\sigma = 7.2 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ et un dipôle $\mathcal{P}_a = 2.6 \times 10^{-19} \text{ J.m}$ tandis que la courbe rouge pour $\sigma = 1.1 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ et $\mathcal{P}_a = 0 \text{ J.m}$.

l'activité de la protéine suivant nos observations précédentes. D'après notre hypothèse cela devrait donc abaisser la courbe jaune en dessous de la courbe rouge prise juste avant ; mais l'effet de l'activité vient compenser cette diminution. On peut donc envisager des cas où les deux effets se compensent. On observe des courbes jaunes et rouges sensiblement superposées (voir fig. III.43).

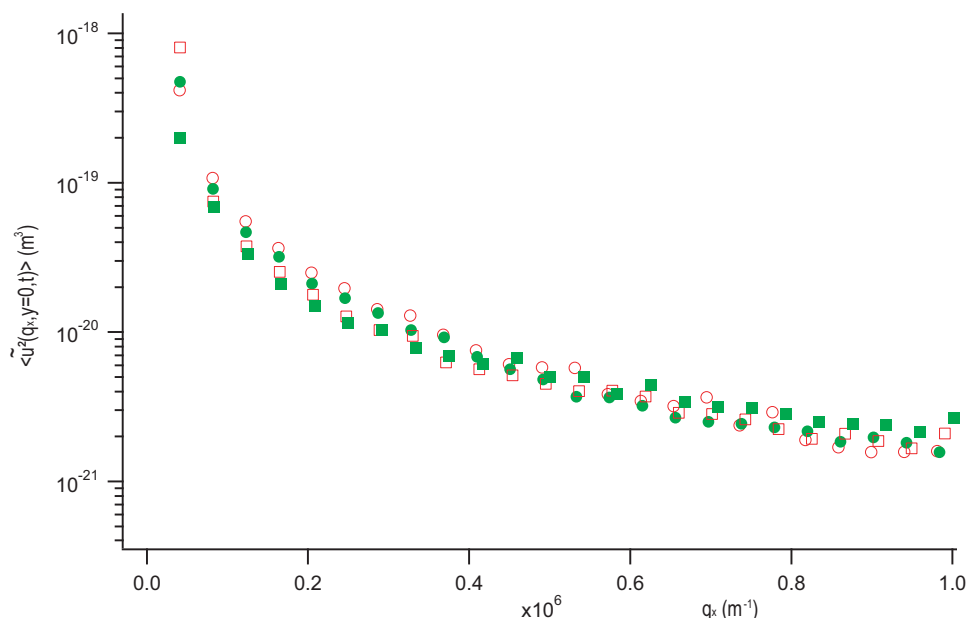


FIG. III.43 – Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours à chaque fois. D'après les hypothèse que nous avons faites au § A.4.3 p. 192, l'incorporation des protéines serait légèrement asymétrique.

Cas d'une incorporation avec une asymétrie plus marquée En reprenant le même raisonnement, il existe des cas où cette asymétrie peut être encore plus marquée. On va se trouver alors dans un cas où les pompes qui établissent un gradient contre une perméation de protons toujours identique, vont pouvoir créer un gradient important comparativement aux deux cas précédents. Ce gradient va avoir pour premier effet d'abaisser le spectre (d'après notre hypothèse), et par ailleurs d'inhiber le pompage. Ainsi l'effet du gradient va être dominant. Maintenant il faut remarquer qu'en moyenne durant les quatre minutes d'acquisition, le gradient est plus important pour un éclairage en jaune que pour un éclairage en rouge ; en effet dans le premier cas, le gradient est entretenu par le pompage des protéines. Par contre durant l'acquisition en rouge, le gradient décroît par perméation. Donc il est pertinent d'attendre les courbes prises en éclairage jaunes en dessous des courbes prises en illumination en rouge juste avant. Il est à noter que pour observer cet effet il est nécessaire que le gradient de charge ait déjà été constitué lors d'un éclairage

précédent. C'est ce que nous retrouvons à la fig. III.44. On voit que dans le premier cycle, l'effet de l'activité domine.

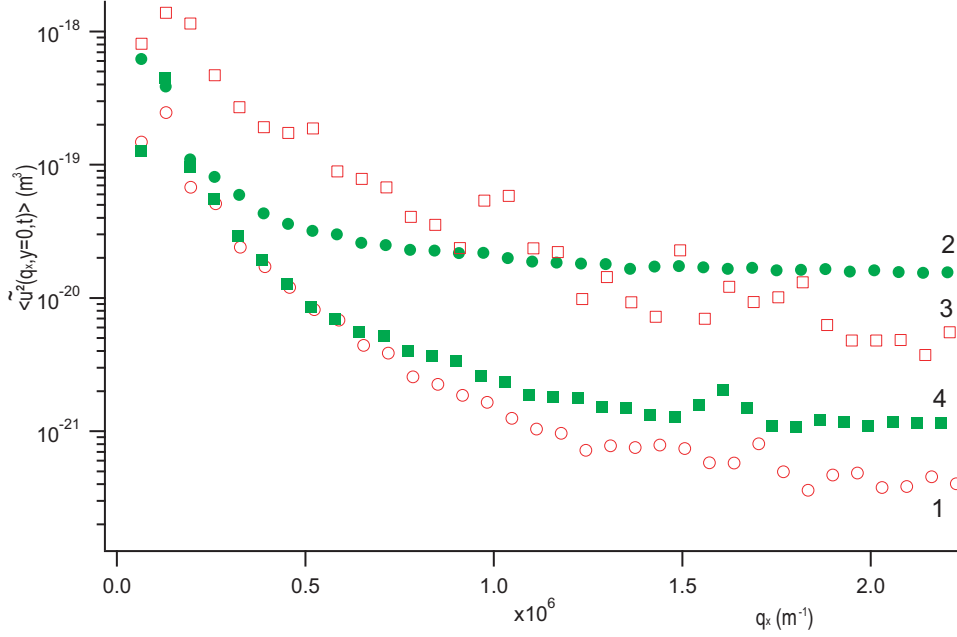


FIG. III.44 – *Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge (cercles vides rouges), puis en jaune (ronds verts), puis de nouveau en rouge (carrés vides rouges) et enfin en jaune (carrés pleins verts). Il s'agit de l'acquisition de 5000 contours à chaque fois. D'après les hypothèse que nous avons faites au § A.4.3 p. 192, l'incorporation des protéines serait assez asymétrique. On observe dans le cas de la première paire de courbe que le gradient n'est pas constitué, donc l'effet de l'activité domine et nous retrouvons la courbe jaune au dessus de la courbe rouge, tandis qu'ensuite, on est proche de la saturation et on observe l'inversion des courbes, soit la courbe jaune en dessous de la courbe rouge.*

A.5 Conclusion

Notre technique nous a permis de mesurer les spectres de vésicules contenant de la bactériorhodopsine. Nous avons vu tout d'abord que les spectres des vésicules contenant de la protéine passive étaient très différents des spectres de vésicules simplement lipidiques. Le *fit* ne peut pas être fait avec une expression contenant une simple renormalisation du module de rigidité de courbure. Cette différence importante est peut-être due à la forte concentration de protéines, pas prise en compte dans la théorie.

Nous avons montré ensuite que la plupart du temps, les spectres de la membrane active étaient différents de ceux de la membrane passive, montrant que cette activité

se reflétait bien sur les spectres. Cependant, il n'est pas possible de «fitter» simplement les courbes avec les modèles actuels, car les effets de l'activité sont compliqués probablement par les potentiels transmembranaires créés par les protéines.

Afin de valider nos hypothèses, différentes expériences restent encore à faire : mesure du spectre de fluctuations où on a maintenu pendant un temps long (30 minutes par exemple) un éclairage en rouge pour s'assurer qu'aucun gradient résiduel ne subsiste avant la mesure ; l'autre expérience serait de faire des mesures sur un nombre de vésicules suffisant dans des conditions d'éclairement très contrôlées (par exemple une acquisition en rouge, avant tout pour montrer le spectre de la vésicule en l'absence de gradient), puis une succession d'acquisitions dans la configuration active, pour mesurer l'effet de l'apparition du gradient de protons cumulé à l'effet de l'activité, puis une série de mesures en rouge, donc avec la vésicule passive, pour mesurer l'évolution du spectre au cours de la relaxation du gradient de protons. Une troisième expérience consisterait à mettre des transporteurs à protons passifs dans la membranes afin de ne pas former un gradient de proton et de n'observer que l'effet de l'activité. Enfin, des expériences avec des concentrations intermédiaires de protéines permettraient aussi de vérifier dans ces conditions si le spectre de la membrane passive peut être décrit par une simple renormalisation du module de rigidité de courbure.

Une autre expérience intéressante serait de refaire les expériences de micropipettes avec notre technique de fabrication des protéoliposomes géants qui diffère de celle utilisée par J.B. Manneville lors de ses expériences de micropipettes. On peut aussi mesurer les spectres obtenus en pratiquant les expériences sur des GUVs préparées selon son protocole.

B. Membranes hors équilibre par apport de lipides

Le but de ce projet était d'étudier la morphologie et la stabilité de membranes soumises à des flux importants de lipides. En effet, par l'endocytose et l'exocytose, les membranes cellulaires sont soumises en permanence à des flux de lipides. Dans cette perspective, J. Solon a mis au point un système permettant d'étudier les conséquences de la fusion de petites vésicules (SUVs, diamètre typique 50 nm) avec une GUV. Pour cela il utilise des membranes de signes opposés. La GUV est chargée négativement (composition : DOPC 90 %, DOPS 10 %) et est mise en contact avec des SUVs chargées positivement (composition : DOPC 90 %, DOTAP 10 %) [Solon et al., 2004]. Il a montré que pour des densités de charges positives suffisantes, soit supérieures à 7 %, les SUVs fusionnent avec la GUV. Il observe alors la séquence suivante : tout d'abord une augmentation des fluctuations, suivi d'un régime de forte déformation de la vésicule et l'apparition d'instabilités tubulaires, et enfin, d'une apparition de microstructures noires et un retour de la vésicule vers la forme sphérique et tendue. Cette séquence est rapide et se produit en quelques dizaines de secondes maximum (voir fig III.45). Un modèle théorique a été développé au laboratoire par P. Girard et J. Prost [Girard, 2004; Girard et al., 2004a] pour rendre compte de ces observations. L'effet principal attendu est la mesure d'une tension effective dépendant de la dynamique des flux de lipides. Dans notre cas on s'attend à ce que

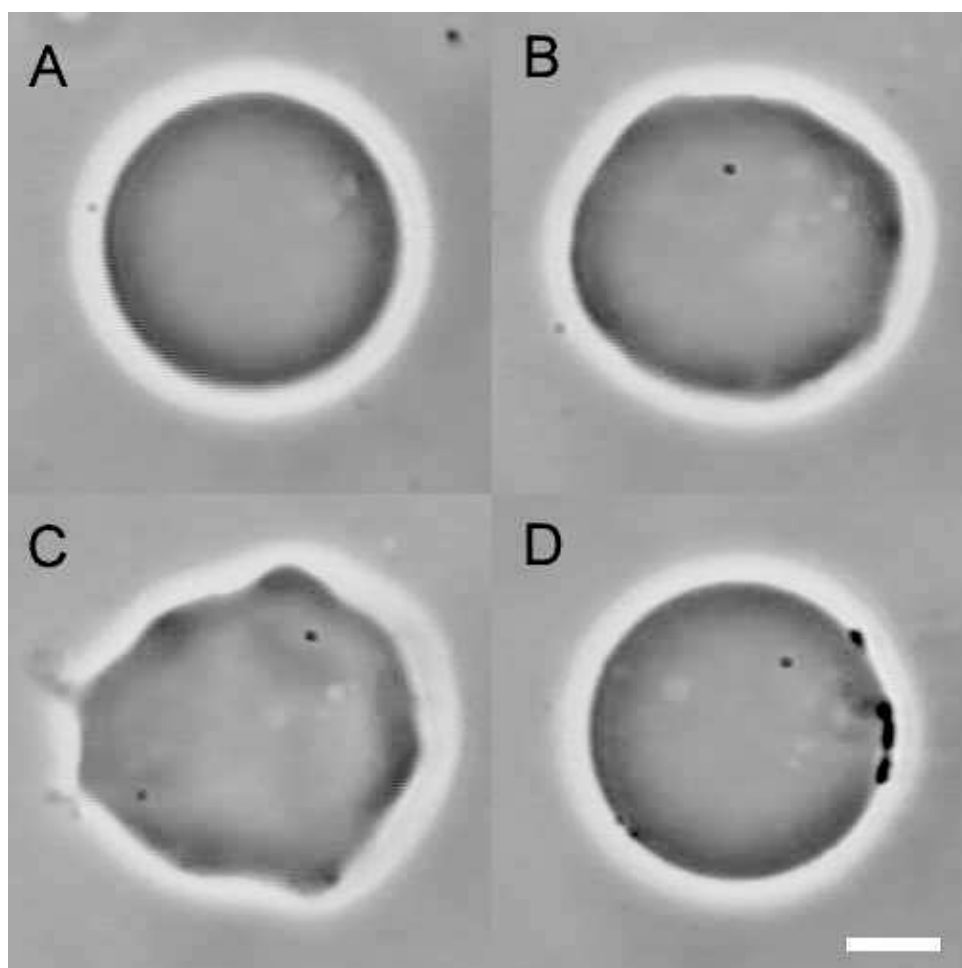


FIG. III.45 – *Séquence de fusion de SUV chargée positivement, de composition DOPC (90 %)/ DOTAP (10 %) avec une GUV chargée négativement de composition DOPC (90 %)/ DOPS (10 %), prise en contraste de phase ; la barre représente 10 μm . (A) La vésicule est injectée dans la solution de SUVs, (B) après 10 secondes environ, on observe une amplification des fluctuations, (C) suivie ensuite d'importante déformations et d'instabilités tubulaires. (D) Enfin, la vésicule se retend et on observe l'apparition d'agréats denses sur la membrane.*

la tension de la vésicule diminue à cause de la fusion des petites vésicules jusqu'à devenir éventuellement négative pendant une période transitoire.

Dans ce cadre nous avons adapté notre algorithme pour l'étude de ce système, dans le régime de fluctuation pour connaître la tension (en supposant la vésicule quasi à l'équilibre), puis dans le régime de déformation pour tirer des paramètres physiques caractéristiques et pouvant amener à une comparaison avec la théorie développée au laboratoire.

Nous avons tiré profit du fait que notre procédé faisait l'acquisition des contours en temps réel pour étudier, de manière non perturbative, un phénomène rapide. Il a été nécessaire toutefois d'adapter l'analyse, comme nous allons le détailler au fur et à mesure de l'explication de ces expériences.

B.1 Mesures effectuées dans un régime quasi à l'équilibre

B.1.1 Périmètre du contour

Cette mesure très directe dans le cas de la reconnaissance de contour peut nous permettre de mesurer une grandeur reliée à l'ajout de surface au cours du temps. En effet, même si on ne peut pas relier quantitativement le périmètre à l'ajout de surface, sans connaissance du spectre à trois dimensions de la vésicules (projeté sur les harmoniques sphériques par exemple), il reste néanmoins possible d'utiliser cette mesure uniquement qualitativement ; c'est ce que nous nous sommes bornés à faire dans notre cas. On pourra voir un exemple fig. III.46. On peut voir ainsi que le périmètre augmente d'environ 10 % (parfois plus) en quelques secondes.

B.1.2 Spectre de fluctuation moyenné sur des temps courts

Pendant les première secondes où se produit la fusion, la vésicule n'est pas déformée et on observe que ses fluctuations augmentent. Nous avons utilisé nos algorithmes pour analyser les fluctuations dans ce régime en faisant deux hypothèses ; la première est que, même dans le cas d'une moyenne des fluctuations de chaque mode faite sur quelques secondes, on obtient une valeur proche d'une moyenne d'état. La deuxième hypothèse est que le système est quasi à l'équilibre thermodynamique, et que donc les expressions développées sur les vésicules passives peuvent être appliquées^b. Ceci est vrai uniquement dans la première phase du phénomène. Nous avons donc réalisé une moyenne glissante sur 60 contours (soit deux secondes) pour déduire la tension et sa variation par ajustement des spectres de fluctuation ainsi moyennés par les courbes théoriques. On obtient ainsi la variation de la tension au cours du temps (voir fig. III.46). Il est à noter la précision sur les plus petits modes étant la meilleure, ils sont correctement donnés même par des moyennes sur une soixantaine

b. La vérification de base de cette méthode a été de prendre une vésicule purement lipidique, à l'équilibre et de regarder la variation que l'on obtient pour la tension au cours du temps, en comparaison avec les valeurs obtenues en moyennant sur l'ensemble de la série. Ce test ayant donné pour la tension des résultats satisfaisants, nous avons poursuivi l'utilisation de cette méthode.

de contours, à la différence des grands modes. Ainsi le début de la courbe étant dominé par la tension (pour des vecteurs d'onde inférieure à $q_c = \sqrt{\sigma/\kappa}$), nous pouvons avoir accès relativement précisément à ce paramètre, par contre le module de rigidité de courbure dominant pour des vecteurs d'onde supérieur à q_c , nous n'y avons accès dans ce cas que de manière très imprécise. De là nous avons pu noter que

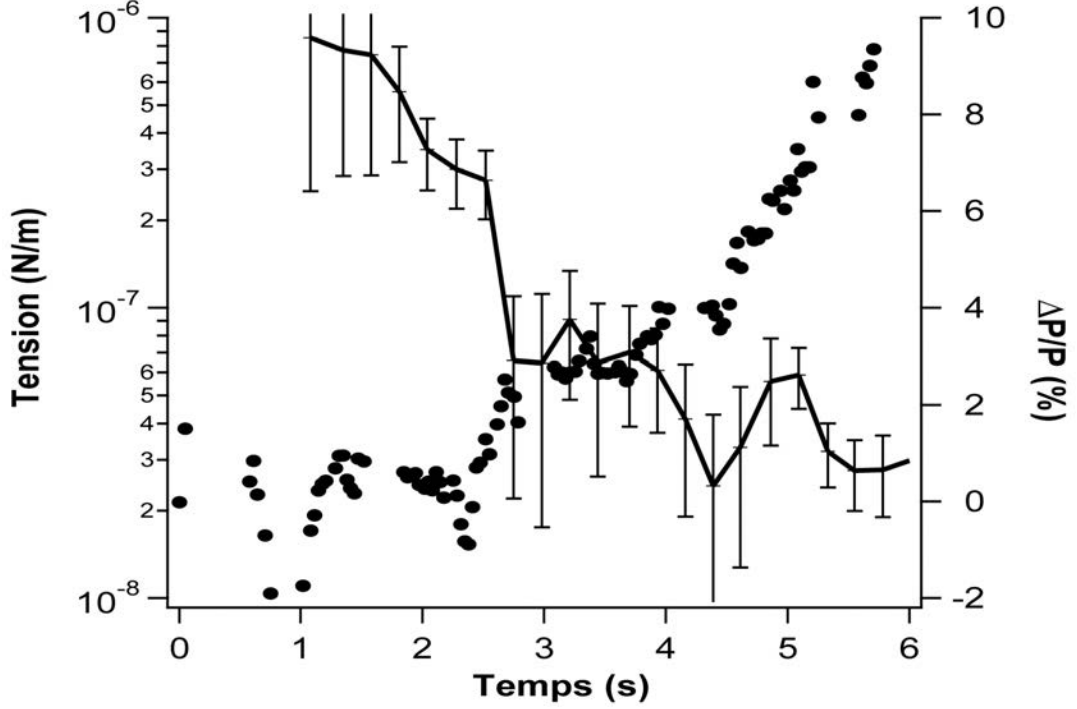


FIG. III.46 – Tracé de la tension et de la variation relative du périmètre ΔP au cours du temps (rond plein) au cours du temps, avec les barres d'erreurs sur la tension (calculées d'après le § A.3.2 p. 171). Cette courbe est pour une *GUV* négativement chargée (10 % de *DOPS*) mise en contact avec des *SUVs* chargées positivement (*DOTAP* 10 %).

la tension décroît fortement dans ce premier régime d'au moins un ordre de grandeur jusqu'à descendre en dessous du seuil de «mesurabilité» avec notre technique que nous situons à 10^{-8} N/m.

Nous avons également pu étudier l'évolution des spectres de fluctuations au cours du temps (fig. III.47). Une analyse simple a permis de montrer que le système était tout d'abord dans un état quasi à l'équilibre ; ce qui justifiait la mesure de la tension que nous avons faite ; et rapidement (après quelques secondes) cela a permis de montrer que le système devenait complètement hors équilibre.

B.2 Etude des premiers modes et de leurs fluctuations

Nous avons ensuite tenter de caractériser la phase de déformation de la vésicule ; à cette étape l'hypothèse d'un phénomène quasi à l'équilibre n'est plus valable et donc

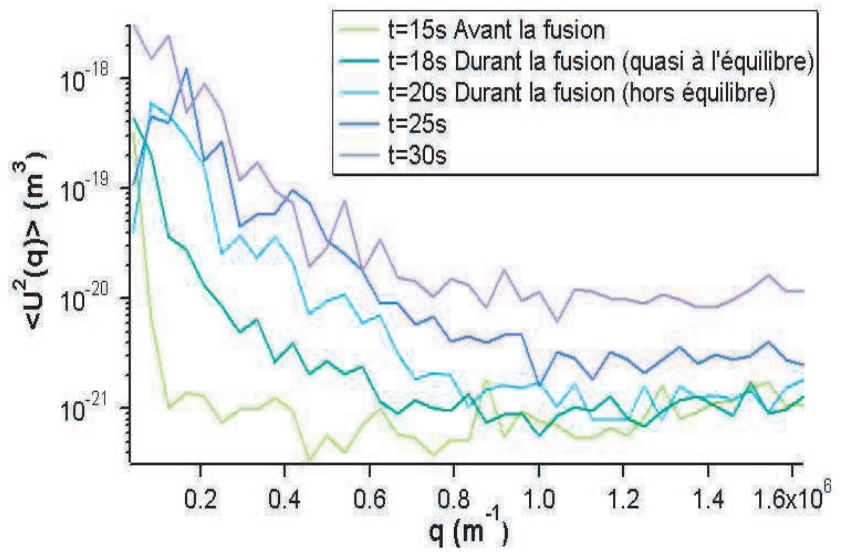


FIG. III.47 – Evolution des spectres de fluctuations d'une vésicule durant le processus de fusion. Il s'agit du même système que la figure précédente.

le spectre de fluctuation ne peut plus être analysé avec les expressions applicables aux vésicules à l'équilibre. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'évolution au cours du temps de l'amplitude des premiers modes et de leurs fluctuations.

Les premiers modes correspondent à la forme générale de la vésicule et vont donc nous renseigner sur ses changements de forme.

B.2.1 Utilisation des critères de changements de forme à l'équilibre

Comme nous l'avons explicité au § B.1.4 p. 14, on peut tracer un diagramme de phase des formes de la vésicule avec deux paramètres : le volume réduit et la différence d'aire^c effective, et en fonction du rapport entre le module d'élasticité de courbure et le module d'élasticité de courbure non local. Néanmoins ces développements ont été faits à l'équilibre thermodynamique, et donc ils ne seront utilisables qu'avec l'hypothèse que nous sommes quasi à l'équilibre, ce qui n'est vrai qu'au début de la phase de déformation des vésicules.

En pratique, il se dégage de [Döbereiner et al., 2003; Döbereiner et al., 1997; Döbereiner, 1999] qu'une transition d'une forme *oblate* vers *prolate* s'accompagne d'une augmentation des modes 2 et 4 ; la transition inverse induit un pic de fluctuation du mode 2 au moment de la transition. Par ailleurs une transition conduisant à la formation d'un bourgeon (*budding*) à partir d'une vésicule *prolate*, est signalée par une augmentation des fluctuations du mode 3. Nous avons étudié l'évolution de l'amplitude des modes au cours du temps (et non les fluctuations des modes) (voir fig. III.48).

c. entre feuillet intérieur et feuillet extérieur de la bicouche.

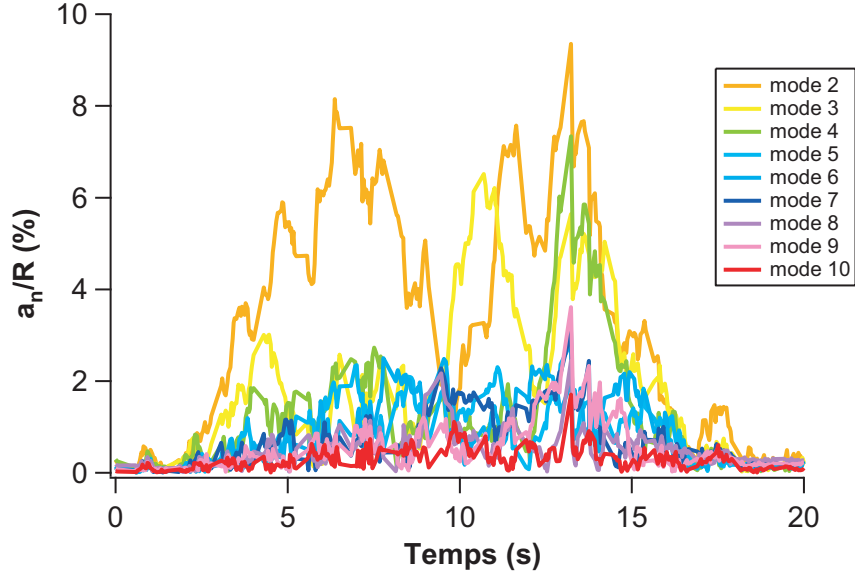


FIG. III.48 – Tracé au cours du temps de l'amplitudes des premiers modes de la même vésicule qu'à la figure III.46 p. 201. L'amplitude est donnée en pourcentage du rayon de la vésicule.

Nous avons ainsi montré que l'amplitude de tous les modes étaient fortement amplifiée au bout de quelques secondes, et qu'à ce moment là la membrane était alors hors-équilibre à cause de phénomènes de fusion.

Le spectre de fluctuations de ce type de membranes hors équilibre n'a pas encore été calculé. Nous ne pouvons donc pas analyser les contours détectés dans l'état actuel des choses. Cependant nous avons développé un autre type de mesure, celle des fonctions d'autocorrélation temporelle.

B.3 Fonction d'autocorrélation temporelle des modes

Comme nous l'avons explicité au début de cette section, l'analyse de Fourier nécessite de prendre en compte plusieurs paramètres, tel le passage des séries de Fourier à une représentation en transformée de Fourier, la géométrie des vésicules, l'aspect système fini, l'observation dans le plan équatorial ainsi que l'intégration en temps. Ces divers points sont pris en compte de manière analogue dans le calcul des fonctions d'autocorrélation en temps $\langle |u(q_x, y = 0, t = 0).u(q_x, y = 0, t)| \rangle$. Comme pour le spectre de fluctuations, ces fonctions peuvent soit être moyennées sur toute une série de contours, soit 3 à 4 minutes, soit sur quelques secondes avec toujours l'hypothèse que l'on reste proche des valeurs des moyennes d'états.

B.3.1 Principe

La fonction que nous calculons est

$$\frac{\langle |c_n(t)c_n(t+\tau)| \rangle - \langle |c_n(t)| \rangle \langle |c_n(t+\tau)| \rangle}{\langle |c_n(t)|^2 \rangle - \langle |c_n(t)| \rangle^2} \quad (\text{III.4.6})$$

où les crochets signifient une moyenne prise sur une fenêtre de temps $[t_1, t_2]$ que l'on suppose proche d'une moyenne d'état. Pour cela nous avons par interpolation linéaire calculé les valeurs des $c_n(t)$ à intervalles réguliers. Comme le contour dans la phase hors équilibre est fortement fluctuant la reconnaissance est parfois gênée. Toutefois, nous avons veillé à ne pas calculer par interpolations les acquisitions qui manquent pour éviter de donner un poids supplémentaire aux contours précédant et suivant le trou. Enfin, cette moyenne se faisant sur une fenêtre, où des trous sont présents, nous avons éliminé les valeurs des fonctions d'autocorrélations moyennées sur moins de 10 paires de points. On trouvera une illustration de l'algorithme à la figure III.49.

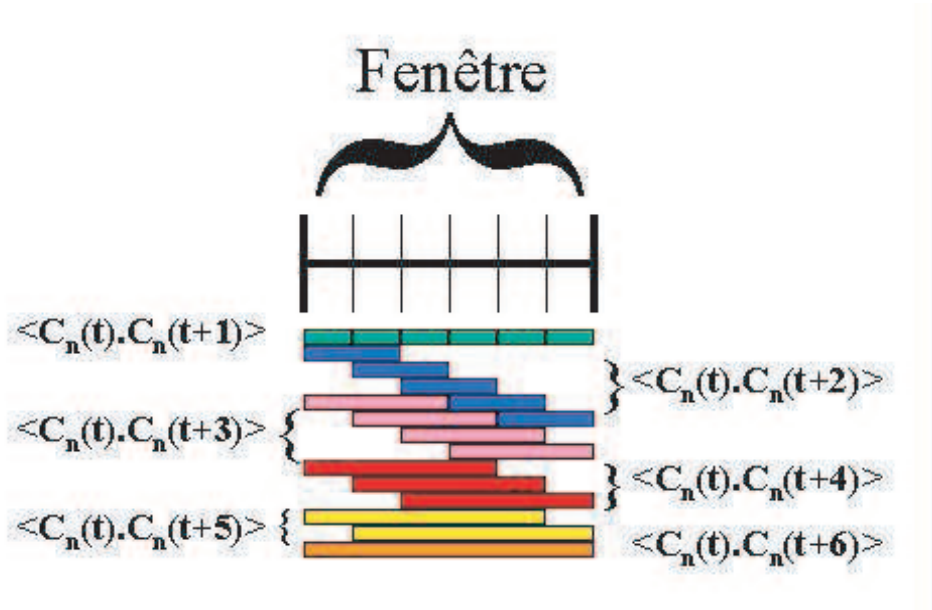


FIG. III.49 – Principe de calcul de la fonction d'autocorrélation. La fenêtre sur laquelle on calcule la fonction est représentée en noir. Chaque rectangle de couleur représente une paire d'amplitudes c_n et chaque couleur une valeur de τ . Le calcul est fait en moyennant à τ donné (soit à couleur donnée) sur toutes les paires de points espacés de τ . On détermine ainsi le numérateur de la fonction donnée à l'eq. III.4.6 (d'après [Solon, 2004]).

B.3.2 Validation sur les membranes passives

Afin de valider nos expériences, nous avons vérifié que nous étions capables de retrouver sur une vésicule passive le comportement prévu par la théorie. Cette mesure a été faite sur une vésicule de SOPC à l'équilibre thermodynamique. Le temps de corrélation est de l'ordre du temps caractéristique qui apparaît dans l'équation de Langevin pour un système passif, soit

$$\tau_m = \frac{4\eta q_{\perp}}{\sigma q_{\perp}^2 + \kappa q_{\perp}^4} \quad (\text{III.4.7})$$

La vésicule d'EPC que nous avons étudiée avait une tension $\sigma = 1.9 \times 10^{-7}$ N/m et un module de rigidité de courbure de $\kappa = 2.2 \times 10^{-20}$ J. Ainsi le temps de décroissance exponentielle calculée pour le mode 2 est de 0.2 s, ce qu'on retrouve bien dans le test figure III.50. On trace aussi les fonction d'autocorrélation moyennée sur une fenêtre

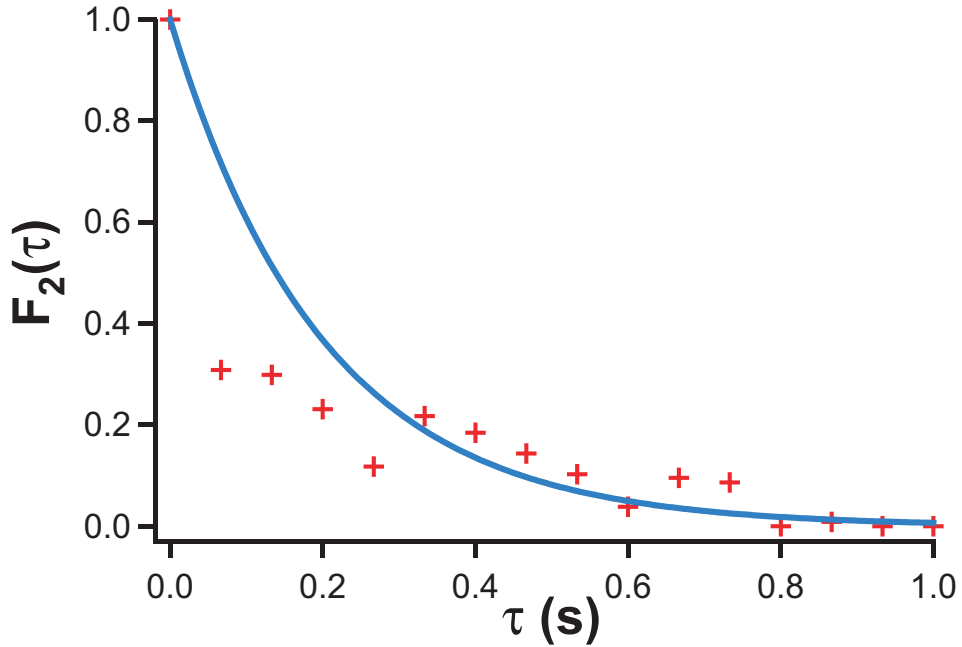


FIG. III.50 – *Fonction d'autocorrélation temporelle pour le mode 2 d'une vésicule d'EPC à l'équilibre. Les croix rouges représentent les points mesurés et la ligne bleue la fonction d'autocorrélation correspondante si on suppose une décroissance exponentielle de temps caractéristique donné par l'équation III.4.7 pour les paramètres mesurés de cette vésicules, soit une tension de $\sigma = 1.9 \times 10^{-7}$ N/m et un module de rigidité de courbure de $\kappa = 2.2 \times 10^{-20}$ J.*

de deux secondes, en fonction du temps. On observe là aussi pour le mode 2 un temps caractéristique de l'ordre de 0.2 s et pour les modes 5 et 10 des temps inférieurs à notre résolution de 33 ms fixée par la vitesse de la caméra (voir fig. III.51).

Il faut noter que dans le cas des systèmes à l'équilibre, cette méthode ne permet mesurer les temps d'autocorrélation car ils sont en dessous ou à la limite de la réso-

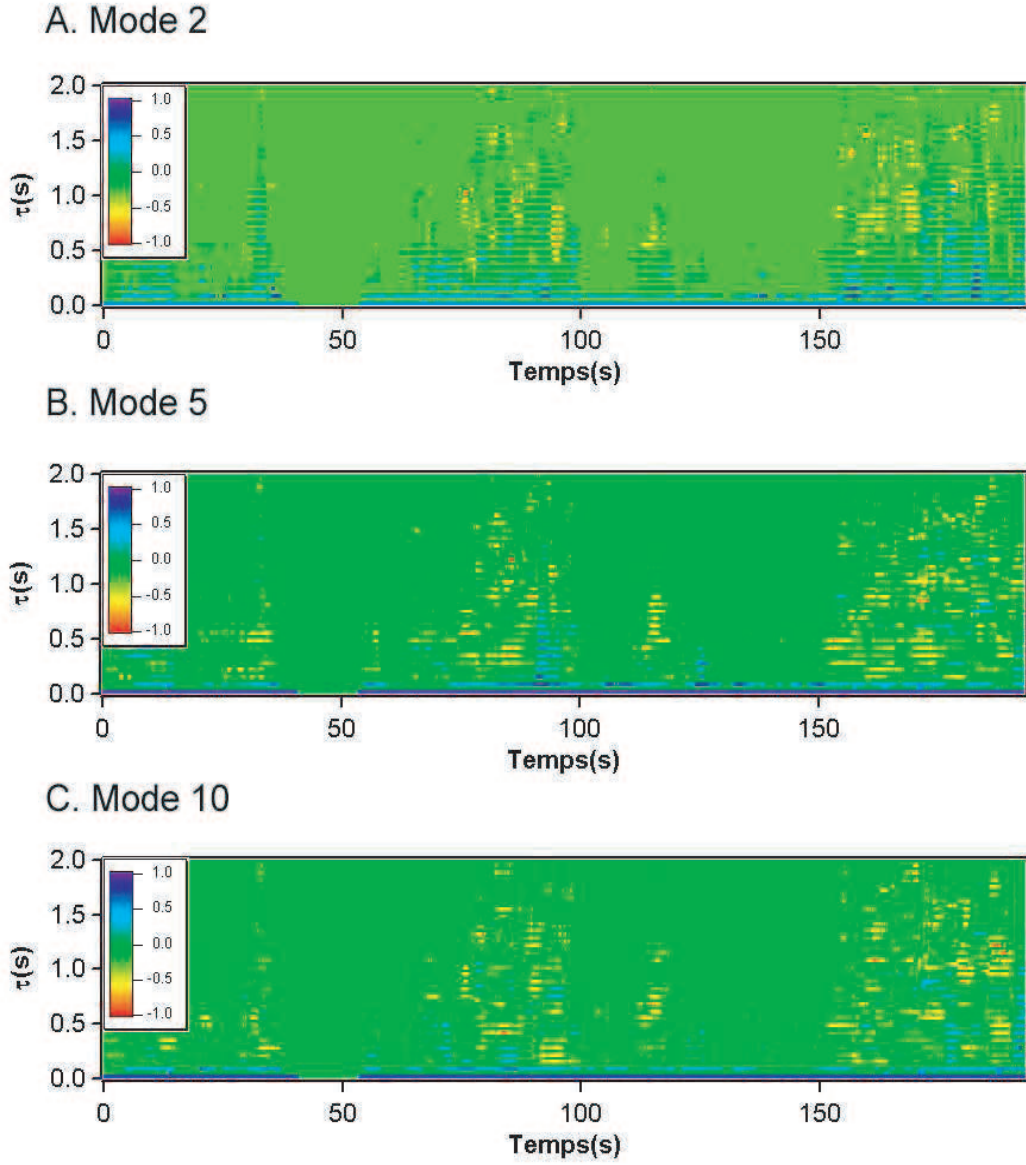


FIG. III.51 – *Fonction d'autocorrélation temporelle d'une vésicule d'EPC à l'équilibre pour les modes 2, 5 et 10 calculées sur une fenêtre de 2 secondes et tracée au cours du temps. L'abscisse représente l'instant t de l'acquisition, et l'ordonnée le temps de corrélation τ ; l'amplitude des corrélations $\langle |u(t)u(t + \tau)| \rangle$ est représentée par le gradient de couleurs. On peut remarquer que ces modes sont très vite décorrélés conformément aux prévisions théoriques (eq. III.4.7) pour une vésicule d'EPC à l'équilibre.*

lution de nos appareils. Par contre ils vont nous permettre des mesures intéressantes dans le cas des vésicules hors équilibre.

B.3.3 Résultat sur le système hors équilibre

En appliquant maintenant cette méthode aux vésicules hors équilibre par apport de lipides, nous obtenons des fonctions d'autocorrélation du type de celle reproduite figure III.52. On remarque sur ce graphe une augmentation du temps de corrélations, puis une inversion pendant quelques secondes où on n'a pas de corrélation aux petits τ et des corrélations à grand τ ; la fonction reprend ensuite son comportement initial. En dessous, un graphe de l'amplitude de fluctuation du mode 2, qui permet de savoir les moments où le premier graphe est pertinent (amplitudes importantes) et les moments où les amplitudes sont faibles et donc les fonctions d'autocorrélation entachées d'erreurs importantes. Une telle augmentation du temps de corrélation ne peut se faire que dans un régime de tension négative, résultats en cohérence avec les prédictions théoriques du modèle de P. Girard et J. Prost. De plus l'apparition de corrélation à temps long plus importante que les corrélations à temps court est une autre signature de ce phénomène.

B.4 Conclusion

Nous avons vu ici que notre programme de reconnaissance de contours, grâce à sa fréquence d'acquisition, est capable de suivre la cinétique de phénomènes assez rapides. Nous avons été amenés à développer de nouveaux outils d'analyse pour suivre la variation de la tension pendant ces phénomènes de fusion membranaire. Ils ont ainsi permis de montrer que la tension de la membrane soumise à un flux hors-équilibre de lipides diminuait jusqu'à devenir négative, ce qui provoquait l'apparition d'instabilités et éventuellement la formation des agrégats lipidiques.

Ce travail présente les premières preuves d'une tension négative dans ces conditions. La comparaison avec la théorie reste encore à faire car le modèle devra être adapté à ces conditions expérimentales et probablement intégrer des effets non linéaires, puis prendre en compte les moyennes glissantes que nous avons dû faire pour obtenir une statistique suffisante.

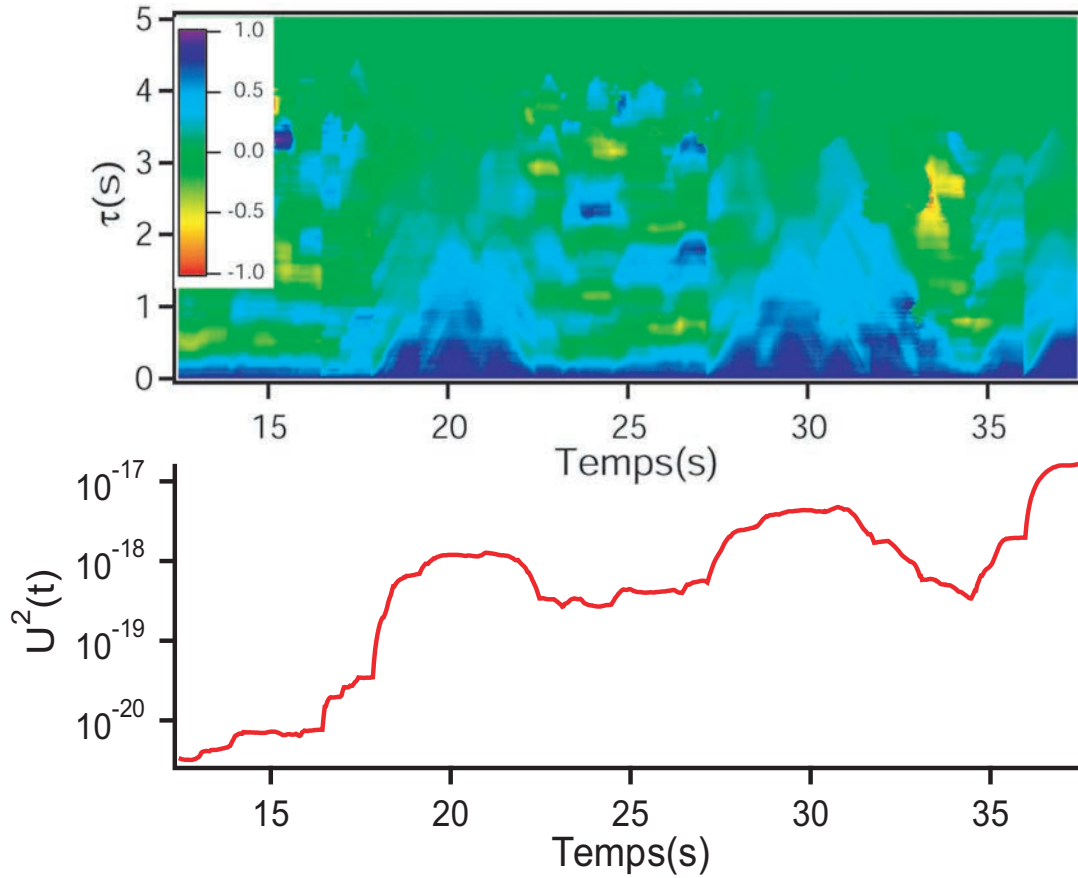


FIG. III.52 – En haut, évolution au cours du temps de la fonction d'autocorrélation du mode 2. On a représenté en valeur normalisée à 1, $\langle |u(t) \cdot u(t + \tau)| \rangle$ où le temps t est en abscisse et le temps τ de corrélation en ordonnée. L'amplitude des corrélations est représentée par la palette de couleur à gauche. En bas, variation de l'amplitude des fluctuations au cours du temps, moyennée sur la même fenêtre de 5 secondes, que celle utilisée pour les mesures du temps de corrélation.

Quatrième partie

Conclusion

Les vésicules géantes lipidiques ont été un sujet d'étude d'une grande richesse depuis 30 ans. En effet, leur physique est particulièrement intéressante mais elle sont aussi un bon modèle pour mimer la membrane plasmique des cellule. Les membranes à l'équilibre ont donné lieu à de très nombreuses études. Néanmoins, cela de doit pas occulter la grande complexité des membranes biologiques ; en comparaison les modèles proposés par les physiciens sont des simplifications extrêmes des situations biologiques. A ce titre la compréhension des membranes hors équilibre est un pas qui rapproche le système modèle des vésicules géantes de la membrane plasmique.

Dans cette thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux membranes actives et tout spécialement celles qui sont mises hors équilibre thermodynamique par la présence de canaux ou de pompes dans la membrane. En effet des développements théoriques récents ont prévu l'amplification des fluctuations ordinairement dues au mouvement brownien des molécules du solvant par l'activité de tels centres actifs. Des expériences de micropipettes sont venues confirmer ces prédictions théoriques.

Nous avons alors souhaité développer une méthode capable d'analyser en temps réel les fluctuations d'une vésicule. Deux principales méthodes existaient déjà. Une méthode basée sur l'analyse en harmoniques sphériques ne permettait que l'étude d'objets proches de la forme sphérique d'une part ; d'autre part, cette technique présentait la contrainte forte de ne pouvoir comparer ses résultats qu'avec une théorie des membranes développée sur les harmoniques sphériques. Or les théorie des membranes actives ne sont disponibles que pour des membranes planes. L'autre technique de laquelle nous sommes partis avait l'avantage de ne pas contraindre l'analyse en harmoniques sphériques, ni de se cantonner aux objets quasi-sphériques. Toutefois elle n'avait été développée que pour l'étude des formes des vésicules et donc ne permettait l'étude que des premiers modes de déformation et pas, en l'état, l'étude de vésicules hors équilibre.

Nous avons donc décidé de partir de cette dernière technique pour l'améliorer

et permettre ainsi l'étude de vésicules dans toute la gamme des longueurs d'onde optiques. Cela a requis une optimisation de notre système expérimental sur le plan optique, afin d'avoir une image très contrastée et très précise des vésicules ; une optimisation sur le plan de la caméra utilisée et du système d'analyse d'image afin de permettre de répondre à la double contrainte de faire une analyse en temps réel et d'avoir une grande résolution sur la mesure de l'amplitude des fluctuations. Enfin nous avons tiré parti de la connaissance précise de l'image d'une vésicule en microscopie à contraste de phase pour mettre au point un algorithme permettant une mesure de l'amplitude des fluctuations au-delà de la résolution optique. En utilisant pleinement le caractère multitâche des ordinateurs, nous avons ainsi réalisé une procédure de reconnaissance de contours permettant une mesure à la fois en temps réel et très précise des fluctuations.

Nous avons alors développé les outils d'analyse permettant de tirer des informations physiques à partir des contours reconnus par l'algorithme. La première étape a été l'élimination des contours mal reconnus. Ensuite nous avons développé les outils nécessaires à la prise en compte des conditions expérimentales, comme la coupe d'une vésicule par un plan diamétral ; nous avons ensuite montré que dans notre domaine de longueurs d'onde, une théorie développée sur des membranes planes reste adaptée ; enfin nous avons pris en compte l'intégration en temps réalisée au moment de l'acquisition par les caméras. Nous avons aussi fait une évaluation précise des incertitudes expérimentales afin de déterminer les erreurs sur nos mesures.

L'utilisation d'une théorie en membranes planes, la possibilité de reconnaître et d'analyser des objets non sphériques, la détection à la fois précise et en temps réel sont autant d'atout de cette technique pour l'étude des membrane hors équilibre.

Parallèlement au développement de cette technique, nous avons mis au point un protocole expérimental permettant l'étude de vésicules dans un environnement contrôlé. Les techniques utilisés pour des vésicules passives étaient déjà existantes et n'ont nécessité qu'une simple adaptation à notre système afin d'avoir des vésicules de composition bien contrôlée, suffisamment fluctuantes à l'échelle optique. Tout ceci avec la contrainte que l'image des vésicules devait pouvoir se faire avec une grande qualité.

Néanmoins, avant de passer à l'étude des vésicules actives, nous avons validé notre méthode sur les vésicules passives purement lipidiques dont la physique à l'équilibre est bien comprise. Pour cela nous avons développé notre analyse dans ce cas spécifique puis nous avons étudié trois systèmes passifs de module de rigidité de courbure différents. L'étude sur ce système nous a montré que notre technique de reconnaissance et d'analyse de contours permettait bien une mesure du spectre de fluctuation des vésicules. Ces mesures nous ont aussi permis d'identifier les limites de notre technique au niveau de la résolution.

Dans le cas des membranes actives par l'action de pompes, les méthodes de fabrication de telle vésicules existantes ne permettaient pas de préparer un système bien contrôlé. Nous avons ainsi développé pour la bactériorhodopsine qui est la protéine que nous avons étudiée, une nouvelle méthode de fabrication des liposomes géants permettant d'obtenir des protéoliposomes sans agrégats de protéines, contenant une concentration contrôlée de protéines, avec la contrainte que les protéines doivent

rester actives après inclusion dans la membrane. Les tests de cette méthode nous ont montré que nous avons pleinement rempli ces objectifs.

Ainsi, nous avons pu passer à l'étude des membranes actives contenant la bactériorhodopsine. La théorie des membranes actives prévoyait bien des effets visibles sur le spectre de fluctuation du pompage des protons par la protéine. Nous avons effectué des mesures sur ce système expérimental dont le comportement s'est alors révélé plus complexe que la théorie ne le laissait penser. En effet nous avons pu mettre en évidence un effet sur le spectre non seulement de l'activité de la protéine mais aussi de la protéine passive. La théorie des membranes actives, dans son état actuel ne semble pas pouvoir rendre compte des observations. Toutefois nous avons pu émettre l'hypothèse qu'en plus des effets prévus par la théorie, nous observons un effet lié à l'interaction des protéines entre elles car leur concentration surfacique est élevée, ainsi que les conséquences d'un gradient de protons transmembranaire du fait de l'activité de la protéine. Néanmoins, ces hypothèses nécessitent d'autres mesures pour être confirmées ou modifiées.

Notre technique de reconnaissance et d'analyse de contours a donc permis de mettre en évidence pour la première fois les modifications de spectre de fluctuations dues à l'activité d'une protéine mais dans un sens différent que ne le laissait présager les expériences de micropipettes faites précédemment. Sur un système où nous pouvons faire des moyennes sur plusieurs minutes, nous avons pu obtenir des spectres précis sur la gamme des longueurs d'onde optique ; nous avons dû mettre au point une dernière correction dans l'analyse afin de ne pas être limité par la remontée des spectres aux grands vecteurs d'onde liée à la reconnaissance de contour à résolution finie.

Par ailleurs, nous avons étudié en collaboration avec J. Solon un autre système où la membrane est mise hors équilibre par l'apport de lipides. Pour cette application nous avons développé des outils spécifiques permettant l'analyse de phénomènes avec une dynamique rapide. Par ailleurs, nous avons calculé les fonctions d'autocorrélation en temps et ainsi nous avons pu, pour la première fois, mettre en évidence une tension négative induite par l'apport massif de lipides à la membrane de la vésicule.

Sur le plan de la reconnaissance de contours ces mesures n'ont été possibles que grâce à la reconnaissance en temps réel de la vésicule afin de suivre un phénomène relativement rapide et de pouvoir moyenner suffisamment pour avoir des mesures précises sans masquer la dynamique. Par ailleurs, l'étude de ce système nécessite de pouvoir reconnaître et analyser le contours de vésicules loin de la forme sphérique.

Après ce travail il reste de nombreuses questions ouvertes. En effet, d'autres mesures sur les vésicules actives semblent essentielles pour permettre une bonne compréhension des phénomènes, et des conditions dans lesquelles il se produisent pour permettre le développement de la théorie qui à terme permettra de rendre compte des observations. Il semble essentiel de pouvoir réaliser des expériences dans des conditions encore plus contrôlées d'activation ainsi que de faire varier la concentration de protéines pour pouvoir valider ou modifier nos hypothèse. L'étape suivante dans l'étude des membranes active est le passage à une autre protéine afin de dégager les traits généraux du phénomène. Dans ce but, le système de protéoliposomes contenant de l'ATPase Calcium développé au laboratoire par P. Girard et sur lequel

il a montré un effet de l'activité de ces protéines, semble un bon candidat.

Par ailleurs d'autres mesures sur le système de membrane avec apport de lipide seront nécessaire afin de permettre ensuite les développement théoriques nécessaires à la compréhension du phénomène.

Sur le plan de l'analyse de contours, le passage à une analyse en deux étapes serait le prochain pas à franchir dans le but non tant d'améliorer la résolution de la méthode mais de garantir une meilleure reconnaissance y compris dans des cas plus délicats où l'algorithme peut être gêné par de grandes amplitudes de fluctuations qui mettent la membrane légèrement hors focus, ou par des instabilités de type tubes ou amas de lipides formés suite à un phénomène hors équilibre : un premier pour donner un contour grossier de la vésicule et un deuxième pour affiner ce contour, tout en restant bien sûr dans une reconnaissance en temps réel. Ainsi cela implique non seulement la modification des algorithmes mais aussi leur optimisation afin de garantir toujours la cadence des acquisitions.

Enfin, à plus long terme, pour les membranes hors équilibre la prochaine étape serait une mesure du spectre de fluctuation à des vecteurs d'onde plus grands par l'étude par exemple de la diffusion de lumière d'une portion de membrane de vésicule. L'étude de la dynamique serait aussi intéressante avec des techniques plus performantes que la vidéomicroscopie

Cinquième partie

Annexes

Annexe 1

Version originelle de la chambre d'observation

A. Cellule d'observation

Le premier système que nous avons préparé permettait à la fois la thermalisation de la chambre et l'injection contrôlée de fluides. La chambre est composée d'une partie métallique, d'une partie en téflon et finalement d'une partie jetable composée de deux lamelles de verre (voir fig V.1). Dans un premier temps une cellule est construite en verre et parafilm pour s'assurer que les matériaux n'interfèrent pas avec le système^a. En effet le parafilm est simplement composé de paraffine (neutre) et des lamelles peuvent tout-à-fait être assemblées en utilisant sa propriété de fondre vers 150°C. Cela nous permet de fabriquer une cellule avec deux lamelles de verre d'épaisseur typiquement 170 μm . L'ensemble lamelles plus parafilm faisant typiquement 1 mm d'épaisseur. Cette partie en verre contient bien entendu les vésicules. La découpe particulière du parafilm permet de faire un flux de solution au dessus des vésicules qui tombent au fond de la cellule par gravité (elles contiennent une solution de sucrose légèrement plus dense à osmolarité égale que la solution de glucose qui est à l'extérieur). Cette partie en verre et parafilm est refaite à chaque expérience et jetée en fin d'expérience.

Cette cellule est placée dans un dispositif en téflon qui permet l'isolation thermique entre la cellule et le support du microscope. Le téflon est aussi intéressant pour sa capacité à ne pas interagir avec les solutions. De plus cette pièce contient les canaux qui connectent des petits tuyaux reliés à des seringues à la cellule en verre. L'étanchéité est assurée par de la pâte à sceller inerte vis-à-vis des vésicules. Le téflon a aussi l'avantage que cette partie peut être nettoyée avec un mélange à 70 % d'acide sulfurique et 30 % de peroxyde d'hydrogène. Enfin cette partie s'insère dans un support en acier qui fait réservoir thermique pour les modules Pelletier et en même temps rigidifie l'ensemble et permet l'adaptation

a. l'utilisation de colle cyanoacrylate induit la formation de «points noirs» au niveau des vésicules. Les colles époxy contenant une amine, vont quant à elle conduire à l'adhésion des vésicules entre elles et à la formation d'une «mousse de vésicules». Ces colles doivent être proscrites.

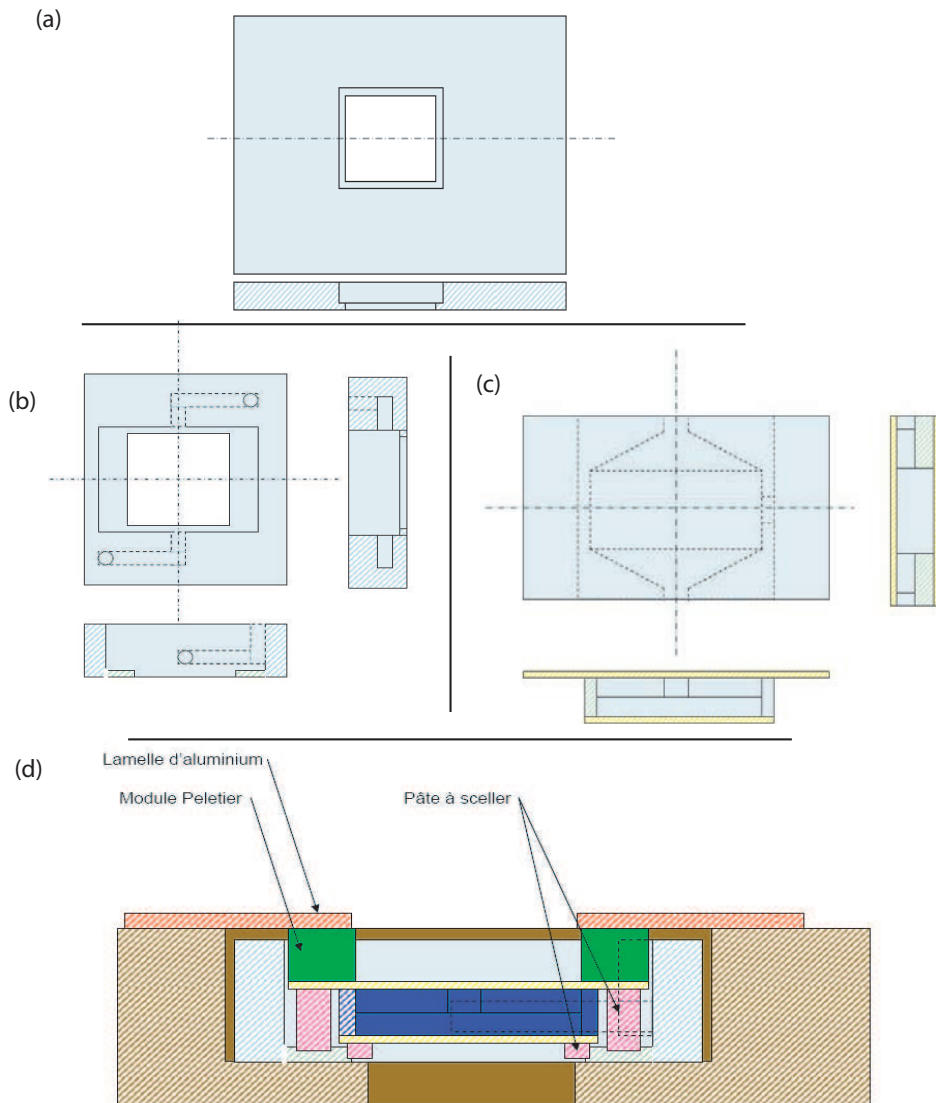


FIG. V.1 – Plan des diverses parties de la cellule d'observation et leur assemblage. (a) partie en métal (acier) de la cellule qui sert de base et en même temps radiateur thermique pour les modules Pelletier. Vue de dessus et coupe suivant le pointillé. (b) partie en téflon avec les circuits pour l'injection de liquide dans la cellule. vue de dessus et 2 coupes suivant des plans perpendiculaires. (c) Partie en verre (jaune) et parafilm (bleu) avec les découpes pour permettre un changement de solution sans emporter les vésicules. (d) assemblage des diverses parties : en brun la partie en acier dans laquelle s'insère la partie en téflon (bleu clair) où s'insère à son tour la cellule elle-même en verre (jaune) et parafilm (bleu). L'étanchéité est faite par de la pâte à sceller (mauve). Enfin on distingue les modules Pelletier qui force le flux de chaleur verticalement entre des plaque en aluminium (rouge) reliées thermiquement à la partie en acier et la cellule elle-même à travers sa partie supérieure en verre.

aux déplacements en XY du microscope. Cette partie n'est pas en contact avec les vésicules ou les solutions.

B. Simplification de la partie flux

Dans un but de simplicité, et pour rendre les manipulations moins délicates, nous avons dans un premier temps supprimé la partie flux, en faisant une cellule sur un seul niveau et en enlevant les différents canaux d'injection.

C. Climatisation de la pièce

Enfin, la climatisation de la pièce nous a permis de nous affranchir du système de régulation en température à partir des modules Pelletier (et d'un thermocouple placé directement dans la solution de GUVs). Ainsi la cellule ne s'est plus réduit qu'à sa partie en verre et parafilm. Cela a permis un transfert plus facile des vésicules avec la méthode de la «pipette cargo». Ce système beaucoup moins encombrant a aussi permis de pouvoir approcher plus facilement le condenseur à immersion de la préparation.

Sixième partie

Tables et index

Abbreviations et notations utilisées

A		Aire microscopique (aire réelle) de la membrane (m^2)
A_p		Aire visible optiquement de la membrane (m^2)
D		Coefficient de diffusion de la protéine dans la membrane (m^2/s)
D_P		Coefficient de diffusion effective du proton à la sortie de la pompe (m^2/s)
F_a		Composante de la force exercée par la protéine lors du pompage indépendamment de la courbure de la membrane (N)
F'_a		Composante de la force exercée par la protéine lors du pompage dépendant de la courbure de la membrane (N.m)
T		Température (K)
ΔA		Variation de l'aire de la membrane (m^2)
Ξ		Coefficient de couplage entre la courbure et la diffusion (J.m)
α		Excès de surface (sans unité)
$\bar{\kappa}$		Module de rigidité de courbure globale (J.m^2)
χ	...	Module de compressibilité pour la diffusion des protéines dans la membrane (J.m^2).
χ_{ce}		Module de compressibilité-extension de la membrane (J/m^2)
η		Viscosité du milieu environnant (kg/m.s)
κ		Module de rigidité de courbure (J)
λ_p		Perméation à l'eau de la membrane ($\text{m}^3/\text{N.s}$)
$\mathbf{f}_h$		Force stochastique modélisant le bruit thermique en volume (N/m^3)
ψ		Concentration «algébrique» de protéines (m^{-2})
ψ_0		Concentration «algébrique» optimale de protéines (m^{-2})
$\mathbf{q}_\perp$	..	Vecteur d'onde correspondant au vecteur position dans la représentation de Monge (m^{-1})
ρ		Concentration moyenne de protéines indifféremment de leur sens (m^{-2})
ρ^+		Concentration de protéines pompant les ions dans le sens des z positifs (m^{-2})
ρ^-		Concentration de protéines pompant les ions dans le sens des z négatifs (m^{-2})
σ		Tension de la membrane (N/m)
τ		Temps d'intégration de la caméra (s)
c_0		Courbure spontanée de la membrane (m^{-1})
f_{th}		Force modélisant le bruit thermique surfacique subit par la membrane (N/m^2)
k		Constante de Boltzmann (J/K)

$q_{\perp}$	Norme du vecteur d'onde correspondant au vecteur position dans la représentation de Monge (m^{-1})
$u(\mathbf{r}_{\perp}, t)$...	Déplacement de la membrane par rapport au plan moyen suivant l'axe (Oz) (m)
$\mathbf{f}_{\psi}$	Contribution à l'équation de diffusion due au bruit thermique
ADE	<i>Area Difference Elasticity</i> : Modèle de courbure prenant en compte un nombre de lipides différent dans les feuillet externe et interne
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BR	BactérioRhodopsine
CCD	<i>Coupled Charge Device</i> : Capteur utilisé par les caméras qui converti la quantité de lumière reçue en une tension
Chol	Cholestérol
DGDG	Di Galactosyl Di Glycéride
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> : Microscopie à contraste interférentiel par variation de l'indice optique
DMDG	Di Myristoyl Di Glycéride
DMF	Di Méthyl Formamide
DMPC	Di Myristoyl Phosphatidyl Choline
DOPC	Di Oleoyl Phosphatidyl Choline
DOPS	Di Oleoyl Posphatidyl Sérine
DPPC	Di Palmitoyl Phosphatidyl Choline
Diacyl-PA	Acide Diacyl Phosphatidique
Diacyl-PC	Diacyl Phosphatidyl Choline
Diacyl-PE	Diacyl Phosphatidyl Ethanolamine
Diacyl-PG	Diacyl Phosphatidyl Glycérol
Diacyl-PI	Diacyl Phosphatidyl Inositol
Diacyl-PS	Diacyl Phosphatidyl Sérine
EPC	<i>Egg Phosphatidyl Choline</i> : mélange de Diacyl Phosphatidyl Choline extraites du jaune d'oeuf
FITC	Fluoresceïne Iso Thio Cyanate
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> : Recouvrement de fluoresecence après photoblanchiment
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfert</i> : transfert d'énergie de fluorescence
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i> : Vésicules unilamellaires géantes
ITO	<i>Indium Thin Oxide</i> : Oxyde d'étain et d'indium
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> : Grandes vésicules unilamellaires
LysoPC	Lyso Phosphatidyl Choline
LysoPG	Lyso Phosphatidyl Glycerol
MOPS	Acide 3-MorphOlinoPropaneSulfonique
PIPES	Acide Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonique)
POPC	Palmitoyl Oleoyl Phosphatidyl Choline

RICM		<i>Réflexion Interference Contrast Microscopy</i> : microscopie à contraste interférentiel en réflexion
SDS		Sodium Dodecyl Sulfate
SOPC		Stearoyl Oleoyl Phosphatidyl Choline
SUV		<i>Small Unilamellar Vesicles</i> : Petites vésicules unilamellaires
TEM		<i>Transmission Electron Microscopy</i> DP Microscopie électronique en transmission
Tris		2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
rho-DPPE		rhodamine Di Palmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine

Index

- énergie d'extension-compression, 11
- Acquisition d'image, généralités, 84
- Acquisition des images, 92
- ADE, 14
- amphiphile (molécule), 3
- Analogique, codage, 89
- Analogique,signal, 90
- Bactériorhodopsine, cycle, 144
- Bactériorhodopsine, dimensions, 143
- Bactériorhodopsine, lipides natifs, 142
- Bactériorhodopsine, marquage FITC, 152
- Bactériorhodopsine, Origine, 139
- Bactériorhodopsine, relation structure-fonction, 143
- Bactériorhodopsine, spectre d'absorption, 141
- Bactériorhodopsine, structure primaire, 142
- Bactériorhodopsine, structure tertiaire, 143
- Bactériorhodopsine, test d'activité, 161
- Bactériorhodopsine, test d'activité avec la 9-AA, 145
- barres d'erreur, 124
- Caméra analogique, 84
- Caméra digitale, 87
- Caméra, dynamique, 92
- Caméra, précision spatiale, 89
- Carte d'Acquisition, 88
- Carte d'acquisition analogique, 89
- Cellule d'observation simplifiée, 134
- Contour, détection, algorithme actuel, 99
- Contour, détection, améliorations, 103
- Contour, détection, premier algorithme, 95
- contour, fin de l'acquisition, 98
- Contraste de phase, 79
- Couplage courbure diffusion, 40
- Courbure de la vésicule (par rapport aux modèle en membranes planes), 113
- dépôt de lipides en solution, 132
- Darcy (équation de), 42
- DialkylPhosphatidylCholines, 4, 5
- Digital, 89
- Digital, codage, 89
- digital, signal, 91
- Distribution des valeurs des modes, 109
- Domaine de validité de l'analyse de contours, 123
- Effet de la gravité, 172
- Electroformation, 133
- Energie d'inclinaison, 12
- Energie de cisaillement, 11
- Energie de courbure, 12
- Energie de tension, 13
- Entrelacée, 89
- estimation des erreurs, 124
- excès de surface (vésicule passive), 18
- Hamiltonien de Canham-Helfrich, 13
- Hamiltonien des membranes actives, 40
- Hamiltonien, complément due à la présence de protéine, 40
- intégration en temps (correction de), 119
- Integration en temps, vésicules passives, 170
- jitter, 89
- Lame de pousse, séchage, 133
- Limite due à la résolution finie, 121
- limite en vecteur d'onde accessible, 120
- Lipide (lien forme-phase), 7

Lipides (température de transition), 8
 lipides (types de), 5
 Lysolipides, 4, 5

 membrane active, 39
 Membranes lipidiques polymérisées, 32
 membranes planes, 110
 milieu extérieur, 137
 milieu intérieur, 137
 Modélisation «4f» du microscope, 81
 Mode frame, 87
 Mode image avec mémoire de transfert, 85
 Mode image standard, 85
 Montage Experimental, 78

 Nouvelle position, détermination, 100
 Nouvelle position, tests, 102
 Numérique, 89

 périmètre des contours, 105
 PEG (greffage de), 136
 phases (d'une solution de molécules amphiphiles), 6
 phases (pour une molécule amphiphile), 6
 phases (pour une solution de molécules amphiphiles), 4
 Polymersomes, 30
 précision de l'algorithme, 120
 Premier point, détection, 95
 Protéoliposomes, 28
 Protéoliposomes, agrégats de BR, 160
 Protéoliposomes, fabrication, ancienne méthode, 155
 Protéoliposomes, fabrication, nouvelle méthode, 156

 reconnaissance de contour, 92
 renormalisation de κ dans le cas de l'ATPase- Ca^{2+} , 53

 Série de Fourier (projection du contour sur), 111
 solution de lipides (courante), 132
 solution de lipides (stock), 132
 Spectre d'un contour comme une courbe dans un plan, 117
 Spectre de fluctuation passif, 18

 suivant, trouver le point γ version (première de l'algorithme), 96
 Synchronisation, 95

 Tension, 14
 Topologie des vésicules (prise en compte dans l'analyse), 115
 transfert des vésicules, 137
 Transformées de Fourier (passage vers), 112

 Vésicule, 6
 Vésicule en contraste de phase, 81
 Vésicules décorées de polymères, 30
 Vésicules recouvertes de protéines, 29
 Valinomycine, 151

Figures

I.1	Exemples de phases pour une molécule amphiphile	4
I.2	Quelques familles de lipides	5
I.3	Diagramme de phase du DMPC dans l'eau	6
I.4	Différentes structures obtenues en fonction de la forme des lipides .	7
I.5	Différentes formes de vésicules	9
I.6	Image d'une vésicule contenant deux phases	10
I.7	Principaux degrés de liberté d'un lipide dans une bicouche	10
I.8	Différents modes de déformation d'une membrane	12
I.9	Représentation schématique d'une membrane plane fluctuante	16
I.10	Schéma des fluctuations	16
I.11	Schéma indiquant l'aire réelle de la membrane et l'aire projetée . . .	17
I.12	Diagramme de phase des vésicules dans le modèle ADE	20
I.13	Séparations de phase observées avec le mélange (POPC:DPPE 1:1 en rapport molaire)	25
I.14	Séparation de phase observée en microscopie à deux photons sur des GUVs	27
I.15	Polymersomes	31
I.16	Image d'une Vésicule en RISM	34
I.17	Schéma de l'expérience de mesure du module de rigidité de courbure en microscopie confocale	35
I.18	Réseau de tubes de membranes vu en microscopie de fluorescence confocale	37
I.19	Représentation schématique du hamiltonien d'une membrane à deux composants	41
I.20	Représentation schématique des deux derniers termes de l'équation de perméation	43
I.21	Représentation schématique des deux derniers termes de l'équation de Stokes	44
I.22	Simulation des résultats attendus pour les vésicules actives	49
I.23	Image d'une vésicule durant une expérience de micropipette	50
I.24	Effet de l'activité de la protéine sur les fluctuations	52
II.1	Globules Rouges en contraste de phase	58
II.2	Schéma de la reconnaissance de contours basée sur huit points du contour imagé en fluorescence	59
II.3	Vésicule en DIC pour une reconnaissance de deux arcs du contour .	60
II.4	Fluctuation d'intensité du globule rouge dans diverses conditions . .	62

II.5	Amplitude du scintillement d'un globule rouge en fonction de la position le long d'un de ses diamètres	63
II.6	Mesure en quatre points de la position de la membrane d'un globule rouge	63
II.7	Reconnaissance de contour par l'algorithme de minima d'intensité de Engelhardt et al.	64
II.8	Principe de la reconnaissance de contour utilisée par Duwe et al. . .	66
II.9	Vésicule géante de DMPC observée en microscopie à contraste de phase	67
II.10	Reconnaissance de contours de vésicules par la méthode de Faucon et al.	68
II.11	Première reconnaissance de contour par la méthode de Mitov et al. .	70
II.12	Deuxième étape de la reconnaissance de contours par Mitov et al. .	71
II.13	Fluctuations d'une portion de membrane quasi-plane	73
II.14	Vésicule en contraste de phase approchée par une simulation numérique	75
II.15	Schéma résumant les principaux éléments de l'expérience de reconnaissance de contours	78
II.16	Représentation schématique d'un microscope à contraste de phase .	80
II.17	Représentation des amplitudes en fonction du temps pour la microscopie en contraste de phase	80
II.18	Schéma du modèle «4f»	82
II.19	Représentation graphique de l'intensité en fonction de la position dans le plan image	83
II.20	Formation des images obtenues selon les différents modes avec une caméra analogique	86
II.21	Chronogramme à différentes échelles des signaux émis par une caméra au standard CCIR	90
II.22	Chronogramme des différents signaux émis par la caméra digitale PULNIX, TM1040	91
II.23	Schéma de l'implémentation de l'algorithme de reconnaissance de contour	93
II.24	Vésicule et profil de niveau de gris le long d'une ligne horizontale . .	96
II.25	Image en contraste de phase d'une vésicule et détection du premier point	97
II.26	Schéma de fonctionnement de l'algorithme actuel de reconnaissance de contour	99
II.27	Méthode de détection du point suivant	101
II.28	Défauts de reconnaissance caractéristiques modifiant le périmètre . .	106
II.29	Défaut de reconnaissance modifiant notablement l'amplitude des modes	108
II.30	Distribution des valeurs du mode 3 pour une vésicule	109
II.31	Schéma d'une vésicule fluctuante avec les notations utilisées	111
II.32	Écart entre le modèle en harmonique sphérique et le modèle de membrane plane	118
II.33	Schéma d'une membrane plane fluctuant autour de son plan moyen .	118
II.34	Effet de l'intégration en temps sur le spectre de fluctuation (Simulation numérique)	119

II.35	Spectre de fluctuations pour un objet fixe, qui permet de mesurer le bruit de détection	121
II.36	Représentation schématique de la fluctuation de plus courte longueur d'onde détectable	122
II.37	Bruit provenant de la reconnaissance avec une résolution finie	122
II.38	Bruit dû à la résolution finie	123
II.39	Spectre de fluctuation d'une vésicule	124
II.40	Spectre de fluctuation dans le cas où la résolution sur l'amplitude provoque une remontée	125
III.1	Représentation schématique d'une cellule d'électroformation	133
III.2	Image d'une préparation de vésicules d'EPC au cours de l'électroformation	135
III.3	Formule chimique du 3-MercaptoPropylTriméthoxySilane	136
III.4	Formule chimique du Mal-PEG	137
III.5	Schema du modèle expérimental	140
III.6	Spectre d'absorption de la BR	141
III.7	Structure primaire de la BR	142
III.8	Structure tertiaire de la BR	143
III.9	Représentation du cycle de la BR	146
III.10	Modèle courant du cycle du rétinol lors du cycle de la BR	147
III.11	Schéma des mécanismes moléculaires de pompage de la BR	148
III.12	Vue générale de la bactériorhodopsine, avec le rétinol en mauve, ainsi que du trajet du proton	149
III.13	Formule de la 9-AminoAcridine (9-AA)	150
III.14	Mise en évidence du pompage de la BR en LUV	150
III.15	Molécule de Valinomycine.	151
III.16	Formules et nomenclature des tampons Tris, MOPS, PIPES	152
III.17	Formule et spectre d'absorption et d'émission du FITC	153
III.18	Formule du DMF	153
III.19	Image de fluorescence d'une vésicule EPC contenant BR-FITC reconstituée par l'ancienne méthode	156
III.20	Représentation schématique des étapes de reconstitution d'une protéine membranaire en petits liposomes	157
III.21	Formule du Triton X100	158
III.22	Image d'une GUV contenant de la BR obtenue par la nouvelle méthode de reconstitution	160
III.23	Intensité de fluorescence observée pour des GUVs contenant BR . .	161
III.24	Formule chimique de la Pyranine	162
III.25	Absorption de la pyranine en fonction du pH	163
III.26	Fluorescence de la pyranine à l'intérieur de GUVs contenant BR . .	164
III.27	Temps de pompage pour obtenir $pH = 6.1$ depuis $pH = 7.1$	166
III.28	Formule de l'EPC, du SOPC et du Cholestérol	168
III.29	Simulation de la section d'une vésicule reposant sur une surface sous l'effet de la gravité	173
III.30	Amplitudes des fluctuations en fonction du vecteur d'onde	175
III.31	Amplitudes de fluctuation en fonction du vecteur d'onde	176

III.32	Effet de la tension sur les spectres de fluctuations d'une vésicule active et d'une vésicule passive	182
III.33	Effet du dipôle de force sur le spectre de fluctuations pour une vésicule active et une vésicule passive	183
III.34	Effet de la concentration en protéines sur le spectre de fluctuation pour une vésicule active et une vésicule passive	184
III.35	Spectre de fluctuations brut obtenu pour un protéoliposomes contenant de la BR	188
III.36	Spectre de fluctuations brut, corrigé et bruit obtenu pour un protéoliposomes contenant de la BR	188
III.37	Spectre de fluctuations brut, et corrigé pour une vésicule de SOPC .	189
III.38	Image en microscopie confocale d'une vésicule venant de la préparation utilisée pour les expériences	190
III.39	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et ayant complètement relaxé le gradient de protons	191
III.40	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et ayant relaxé le gradient de protons, et ensuite juste après un éclairage de 4 minutes en jaune .	193
III.41	Spectres de fluctuations corrigés pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et en jaune, cas d'une incorporation quasi-symétrique	194
III.42	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine incorporée quasi symétriquement	195
III.43	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et en jaune, cas d'une incorporation des protéines légèrement asymétrique	196
III.44	Spectre de fluctuations corrigé pour une vésicule de SOPC contenant de la Bactériorhodopsine éclairée en rouge et en jaune, cas d'une incorporation des protéines plus asymétrique	197
III.45	Séquence de fusion de SUV chargée positivement avec une GUV chargée négativement	199
III.46	Tracé de la tension et de la variation relative du périmètre au cours du temps	201
III.47	Evolution des spectres de fluctuations d'une vésicule durant le processus de fusion	202
III.48	Tracé au cours du temps de l'amplitudes des premiers modes	203
III.49	Principe de calcul de la fonction d'autocorrélation	204
III.50	Fonction d'autocorrélation temporelle pour le mode 2 d'une vésicule d'EPC à l'équilibre	205
III.51	Fonctions d'autocorrélation temporelle d'une vésicule d'EPC à l'équilibre pour les modes 2, 5 et 10 calculées sur une fenêtre de 2 secondes et tracée au cours du temps	206
III.52	fonction d'autocorrélation du mode 2	208
V.1	Plan des diverses parties de la cellule d'observation et leur assemblage	218

Tables

I.1	Modules élastiques de quelques matériaux	13
I.2	Principaux modèles pour rendre compte de l'élasticité de courbure d'une membrane	15
I.3	Valeurs du module de rigidité de courbure pour quelques lipides à tête PC	24
III.1	Module de rigidité de courbure κ de EPC, SOPC, SOPC:CHOL(1:1)	177
III.2	Modules de rigidité de courbure trouvés par d'autres auteurs	178

Bibliographie

- [Akutsu and Seeling, 1981] Akutsu, H. and Seeling, J. (1981). Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry*, 20:7366–7373.
- [Alberts et al., 1989] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (1989). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York, second edition.
- [Andelman et al., 1992] Andelman, D., Kawakatsu, T., and Kawasaki, K. (1992). Equilibrium shape of two-component unilamellar membranes and vesicles. *Europhys. Lett.*, 19:57–62.
- [Angelova and Dimitrov, 1987] Angelova, M. 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., 1992a] Angelova, M., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J., and Bothorel, P. (1992). AC Field Controlled Formation of giant fluctuating vesicles and bending elasticity measurements. In Lipowsky, R., Richter, D., and Kremer, K., editors, *The structure and conformation of Amphiphilic membranes*, volume 66 of *the structure and conformation of amphiphilic membranes*, pages 178–182. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [Angelova et al., 1992b] Angelova, M., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89:127–131.
- [Arents et al., 1981] Arents, J., van Dekken, H., Hellingwerf, K., and Westerhoff, H. (1981). Linear relation between proton current and pH gradient in bacteriorhodopsin liposomes. *Biochemistry*, 20:5114–5123.
- [Bacri et al., 1996] Bacri, J.-C., Cabuil, V., Cebers, A. C., Menager, C., and Perzynski, R. (1996). Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field. *Europhys. Lett.*, 33:235–240.
- [Baekmark et al., 1995] Baekmark, T., Elender, G., Lasic, D., and Sackmann, E. (1995). Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids and poly(ethylene oxide) lipopolymers and interaction forces with solid surfaces. *Langmuir*, 11:3975–3987.
- [Bagatolli and Gratton, 2000] Bagatolli, L. A. and Gratton, E. (2000). Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys. J.*, 78:290–305.
- [Baumgart et al., 2003] Baumgart, T., Hess, S., and Webb, W. W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425:821–824.

- [Bensimon et al., 1990] Bensimon, D., David, F., Leibler, S., and Pumir, A. (1990). Stability of charged membranes. *J. Phys. France*, 51:689–695.
- [Berndl et al., 1990] Berndl, K., Käs, J., Lipowsky, R., Sackmann, E., and Seifert, K. (1990). Shape transformations of giant vesicles: Extreme sensitivity to bilayer Asymmetry. *Europhys. Lett.*, 13:659–664.
- [Beyer, 1978] Beyer, W. H., editor (1978). *CRC Handbook of mathematical sciences*. CRC Press, Boca Raton, 5th edition.
- [Birge, 1990] Birge, R. R. (1990). Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1096:293–327.
- [Bivas et al., 1987] Bivas, I., Hanusse, P., Bothorel, P., Lalanne, J., and Aguerre-Chariot, O. (1987). An application of the optical microscopy to the determination of the curvature elastic modulus of biological and model membranes. *J. Phys.*, 48:855–867.
- [Bloom et al., 1991] Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. (1991). Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes : a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 24:293–397.
- [Bo and Waugh, 1989] Bo, L. and Waugh, R. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, 55:509–517.
- [Boey et al., 1998] Boey, S. K., Boal, D. H., and Discher, D. (1998). Simulations of the Erythrocyte Cytoskeleton at Large Deformation. I. Microscopic models. *Biophys. J.*, 75:1573–1583.
- [Born and Wolf, 1993] Born, M. and Wolf, E. (1993). *Principles of Optics Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Pergamon Press, Oxford, sixth edition.
- [Boroske and Elwenspoek, 1981] Boroske, E. and Elwenspoek, M. (1981). Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys. J.*, 34:95–109.
- [Boulbitch et al., 2001] Boulbitch, A., Guttenberg, Z., and Sackmann, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys. J.*, 81:2743–2751.
- [Bradley et al., 1997] Bradley, J.-C., Guedeau-Boudeville, M., Jandeau, G., and Lehn, J.-M. (1997). Toposomes bearing stable perforations by the action of an electric field on partially polymerized giant vesicles. *Langmuir*, 13:2457–2462.
- [Breidenich et al., 2000] Breidenich, M., Netz, R. R., and Lipowsky, R. (2000). The shape of polymer-decorated membrane. *Europhys. Lett.*, 49:431–437.
- [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 et al., 2000] Bruinsma, R., Behrisch, A., and Sackmann, E. (2000). Adhesive switching of membranes: Experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 61:4253.
- [Canham, 1970] Canham, P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 26:61–81.
- [Cans et al., 2003] Cans, A.-S., Wittenberg, N., Karlsson, R., Sombers, L., Karlsson, M., Orwar, O., and Ewing, A. (2003). Artificial cells: Unique insights into

- exocytosis using liposomes and lipid nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:400–404.
- [Cantat and Misbah, 1999] Cantat, I. and Misbah, C. (1999). Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 83:880–883.
- [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.
- [Cattel et al., 2003] Cattel, L., Cerruti, M., and Dosio, F. (2003). From conventional to stealth liposomes a new frontier in cancer chemotherapy. *Tumori*, 89:237–249.
- [Cherry et al., 1978] Cherry, R., Müller, U., Henderson, R., and Heyn, M. (1978). Temperature-dependant aggregation of bacteriorhodopsin in dipalmitoyl- and Dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.*, 121:283–298.
- [Cladera et al., 1996] Cladera, J., Rigaud, J.-L., Bottin, H., and Dunach, M. (1996). Functional reconstitution of photosystem I reaction center from *Cyanobacterium synechocystis* sp PCC6803 into liposomes using a new reconstitution procedure. *Journal of Bioenergetics and biomembranes*, 28:505–517.
- [Cohen-Tannoudji et al., 1973] Cohen-Tannoudji, C., Diu, B., and Laloë, F. (1973). *Mécanique Quantique I*. Hermann, Paris.
- [Cuvelier and Nassoy, 2004] Cuvelier, D. and Nassoy, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys. Rev. Lett.*, (submitted).
- [Derényi et al., 2002] Derényi, I., Jülicher, F., and Prost, J. (2002). Formation and Interaction of Membrane Tubes. *Phys. Rev. Lett.*, 88:238101.
- [Deuling and Helfrich, 1976] Deuling, H. J. and Helfrich, W. (1976). Red blood cell shapes as explained on the basis of curvature elasticity. *Biophys. J.*, 16:861–868.
- [Dimova et al., 2000] Dimova, R., Pouligny, B., and Dietrich, C. (2000). Pretransitional effects in dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study. *Biophys. J.*, 79:340–356.
- [Discher et al., 1998] Discher, D., Boal, D. H., and Boey, S. K. (1998). Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. *Biophys. J.*, 75:1584–1597.
- [Discher et al., 1999] Discher, B., Won, Y.-Y., Ege, D., Lee, J.-M., Bates, F., Discher, D., and Hammer, D. (1999). Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, 284:1143–1146.
- [Discher et al., 2002] Discher, B., Bermudez, H., Hammer, D., Discher, D., Won, Y.-Y., and Bates, F. (2002). Cross-linked Polymersome membranes: Vesicles with broadly adjustable properties. *J. Phys. Chem. B*, 106:2848–2854.
- [Dommersnes, 1999] Dommersnes, P. (1999). *Inclusions membranaires anisotropes ou contraintes: interactions de longue portée et comportements collectifs*. PhD thesis, University paris VI.
- [Dommersnes and Fournier, 1999] Dommersnes, P. and Fournier, J. (1999). N-body study of anisotropic membrane inclusions: Membrane mediated interactions of ordered aggregation. *Eur. Phys. J. B*, 12:9–12.
- [Dumas et al., 1997] Dumas, F., Sperotto, M. M., Lebrun, M.-C., Tocanne, J.-F., and Mouritsen, O. (1997). Molecular sorting of lipids by bacteriorhodopsin in dilauroylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine lipid bilayer. *Biophys. J.*, 73:1940–1953.

- [Duwe et al., 1989] Duwe, H.-P., Eggl, P., and Sackmann, E. (1989). The cell-plasma membrane as composite system of two-dimensional liquid crystal and macromolecular network and how to mimic its physical properties. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 166:1–19.
- [Duwe et al., 1990] Duwe, H.-P., Käs, J., and Sackmann, E. (1990). Bending elasticity moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *J. Phys. France*, 51:945–962.
- [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 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., 1997] Döbereiner, H.-G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. (1997). Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 55:4458–4474.
- [Döbereiner, 1999] Döbereiner, H.-G. (1999). *On the Curvature of Membranes*. Habilitation thesis.
- [Döbereiner et al., 1999] Döbereiner, H.-G., Selchow, O., and Lipowsky, R. (1999). Spontaneous curvature of fluid vesicles induced by trans-bilayer sugar asymmetry. *Eur. Biophys. J.*, 28:174.
- [Döbereiner, 2000a] Döbereiner, H.-G. (2000). Private Communication.
- [Döbereiner, 2000b] Döbereiner, H.-G. (2000). Fluctuating vesicle shapes. In Luisi, P. and Walde, P., editors, *Giant vesicles*, volume 6 of *Perspectives in supramolecular Chemistry*. John Wiley and sons, Chichester.
- [Döbereiner, 2000c] Döbereiner, H.-G. (2000). Properties of giant vesicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 5:256–263.
- [Döbereiner et al., 2003] Döbereiner, H.-G., Gompper, G., Haluska, C. K., Kroll, D., Petrov, P., and Riske, K. A. (2003). Advanced Flicker spectroscopy of fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 91:048301.
- [Ebrey, 1993] Ebrey, T. G. (1993). *Light energy transduction in bacteriorhodopsin*. CRC Press Inc.
- [Ehrenberg and Meiri, 1983] Ehrenberg, B. and Meiri, Z. (1983). The bleaching of purple membranes does not change their surface potential. *FEBS*, 164:63–66.
- [Elgsaeter et al., 1986] Elgsaeter, A., Stokke, B., Mikkelsen, A., and Branton, D. (1986). The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234:1217–1223.
- [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.*, 46:395–400.
- [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 Sackmann, 1988] Evans, E. and Sackmann, E. (1988). Translational and rotational drag coefficients for a disk moving in a liquid membrane associated with a rigid substrate. *Journal of Fluid Mechanics*, 194:553.

- [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 Yeung, 1994] Evans, E. and Yeung, A. (1994). Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape. *Chem. Phys. Lipids*, 73:39–56.
- [Evans and Rawicz, 1997] Evans, E. and Rawicz, W. (1997). Elasticity of fuzzy membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 79:2379–2382.
- [Farge and Devaux, 1992] Farge, E. and Devaux, P. F. (1992). Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.*, 61:347–357.
- [Fattal and Ben-Shaul, 1993] Fattal, D. and Ben-Shaul, A. (1993). A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys. J.*, 65:1795–1809.
- [Faucon et al., 1989] Faucon, J., Mitov, M., 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.
- [Fernandez-Puente et al., 1994] Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M., and Méléard, P. (1994). Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers. *Europhys. Lett.*, 28:181–186.
- [Fourcade et al., 1992] Fourcade, B., Mutz, M., and Bensimon, D. (1992). Experimental and theoretical study of toroidal vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 68:2551–2557.
- [Fournier, 1996] Fournier, J. (1996). Non topological saddle-splay and curvature instabilities from anisotropic membrane inclusions. *Phys. Rev. Lett.*, 76:4436–4439.
- [Fournier, 1999] Fournier, J. (1999). Microscopic membrane elasticity and interactions among membrane inclusions: interplay between the shape, dilation, tilt and tilt-difference modes. *Eur. Phys. J. B*, 11:261–272.
- [Fournier et al., 2001] Fournier, J. B., Ajdari, A., and Peliti, L. (2001). Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 86:4970–4973.
- [Fragneto et al., 2003] Fragneto, G., Charitat, T., Bellet-Amalric, E., Cubitt, A., and Graner, F. (2003). Swelling of Phospholipid Floating Bilayers: The Effect of Chain Length. *Langmuir*, 19:7695–7702.
- [Fricke and Sackmann, 1984] Fricke, K. and Sackmann, E. (1984). Variation of frequency spectrum of the erythrocyte flickering caused by aging, osmolarity, temperature and pathological changes. *Biochim. Biophys. Acta*, 803:145–152.
- [Fricke et al., 1986] Fricke, K., Wirthensohn, K., Laxhuber, R., and Sackmann, E. (1986). Flicker spectroscopy of erythrocytes. A sensitive method to study subtle changes of membrane bending stiffness. *Eur. Biophys. J.*, 14:67–81.
- [Fuller and Rand, 2001] Fuller, N. and Rand, R. P. (2001). The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys. J.*, 81:243–254.
- [Geibel et al., 2001] Geibel, S., Friedrich, T., Ormos, P., Wood, P. G., Nagel, G., and Bamberg, E. (2001). The Voltage-Dependent Proton Pumping in

- Bacteriorhodopsin Is Characterized by Optoelectric Behavior. *Biophys. J.*, 81:2059–2068.
- [Gerbeaud, 1998] Gerbeaud, C. (1998). *Effet de l'insertion de protéines et de peptides membranaires sur les propriétés mécaniques et les changements morphologiques de vésicules géantes*. PhD thesis, University Bordeaux I.
- [Giardini et al., 2003] Giardini, P. A., Fletcher, D. A., and Theriot, J. A. (2003). Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:6493–6498.
- [Girard, 2003] Girard, P. (2003). Private Communication.
- [Girard et al., 2004a] Girard, P., Jülicher, F., and Prost, J. (2004). Fluid membranes exchanging materials with external reservoirs. (submitted).
- [Girard, 2004] Girard, P. (2004). *Membranes hors équilibre: échanges et transport actif*. PhD thesis, University Paris VII.
- [Girard et al., 2004b] Girard, P., Pécraux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., and Bassereau, P. (2004). A New Method for the reconstitution of membrane proteins into Giant Unilamellar Vesicles. (submitted).
- [Gittes et al., 1993] Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.*, 120:923–934.
- [Goetz et al., 1999] Goetz, R., Gompper, G., and Lipowsky, R. (1999). Mobility and Elasticity of Self-Assembled Membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 82:221–224.
- [Gompper and Kroll, 1994] Gompper, G. and Kroll, D. (1994). Phase diagram of fluid vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 73:2139–2143.
- [Gompper and Kroll, 1995] Gompper, G. and Kroll, D. (1995). Phase diagram and scaling behavior of fluid vesicles. *Phys. Rev. E*, 51:514–525.
- [Gompper and Kroll, 1996] Gompper, G. and Kroll, D. (1996). Random surface discretizations and the renormalization of the bending rigidity. *J. Phys. I France*, 6:1305–1320.
- [Gompper and Kroll, 1998] Gompper, G. and Kroll, D. (1998). Membranes with fluctuating topology: Monte Carlo simulations. *Phys. Rev. Lett.*, 81:2284–2287.
- [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., Kuchnir Fygenson, D., Nielsen, C., Andersen, O., and Libchaber, A. (1998). Gramicidin Channel kinetics under tension. *Biophys. J.*, 74:328–337.
- [Gu, 2000] Gu, M. (2000). *Advanced Optical Imaging Theory*. Optical Sciences. Springer, Berlin.
- [Gulick-Krzywicki et al., 1987] Gulick-Krzywicki, T., Seigneuret, M., and Rigaud, J.-L. (1987). Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.*, 262:15580–15588.
- [Haupts et al., 1999] Haupts, U., Tittor, J., and Oesterhelt, D. (1999). Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28:367–399.

- [Heberle and Dencher, 1992] Heberle, J. and Dencher, N. (1992). Surface-bound optical probes monitor proton translocation and surface potential change during the bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5996–6000.
- [Helfer et al., 2000] Helfer, E., Harlepp, S., Bourdieu, L., Robert, J., Mackintosh, F., and Chatenay, D. (2000). Microrheology of biopolymer-membrane complexes. *Phys. Rev. Lett.*, 85:457.
- [Helfrich, 1973a] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C*, 28:693–703.
- [Helfrich, 1973b] Helfrich, W. (1973). Lipid Bilayer spheres: deformation and birefringence in magnetic fields. *Physics Lett. A*, 43:409–410.
- [Helfrich and Servuss, 1984] Helfrich, W. and Servuss, R.-M. (1984). Undulations, Steric Interaction and Cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cim.*, 3D:137–151.
- [Helfrich, 1989] Helfrich, W. (1989). Hats and saddles in lipid membranes. *Liquid Crystals*, 5:1647–1658.
- [Hellingwerf et al., 1979] Hellingwerf, K., Arents, J., Scholte, B., and Westerhoff, H. (1979). Bacteriorhodopsin in liposomes. II: Experimental evidence of a theoretical model. *Biochim. Biophys. Acta*, 547:561–582.
- [Henriksen and Ipsen, 2002] Henriksen, J. R. and Ipsen, J. H. (2002). Thermal undulations of quasi-spherical vesicles stabilized by gravity. *Eur. Phys. J. E*, 9:365–374.
- [Henriksen, 2003] Henriksen, J. R. (2003). Private Communication.
- [Heyn et al., 1981] Heyn, M., Cherry, R., and Dencher, N. (1981). Lipid-protein interactions in bacteriorhodopsin-dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 20:840–848.
- [Hotani et al., 1999] Hotani, H., Nomura, F., and Suzuki, Y. (1999). Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 4:358–368.
- [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 dependence of the effective tension of giant vesicles. *J. Phys. II France*, 7:1141–1157.
- [Inoué and Spring, 1997] Inoué, S. and Spring, K. R. (1997). *VideoMicroscopy The Fundamentals*. Plenum Press, New York, second edition.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, 2ème edition.
- [Jansen and Blume, 1995] Jansen, M. and Blume, A. (1995). A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. *Biophys. J.*, 68:997–1008.
- [Julicher and Lipowsky, 1993] Julicher, F. and Lipowsky, R. (1993). Domain-induced budding of vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 70:2964–2967.
- [Julicher and Lipowsky, 1996] Julicher, F. and Lipowsky, R. (1996). Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E*, 53:2670–2683.
- [Kahya et al., 2001] Kahya, N., Pecheur, E. I., de Boeij, W. P., Wiersma, D. A., and Hoekstra, D. (2001). Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion. *Biophys. J.*, 81:1464–1474.

- [Kahya et al., 2002] Kahya, N., Wiersma, D. A., Poolman, B., and Hoekstra, D. (2002). Spatial organization of bacteriorhodopsin in model membranes. Light-induced mobility changes. *J. Biol. Chem.*, 277:39304–11.
- [Khorana, 1988] Khorana, H. (1988). Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. *J. Biol. Chem.*, 263:7439–7442.
- [Kim et al., 1998] Kim, K., Neu, J., and Oster, G. (1998). Curvature-mediated interactions between membrane proteins. *Biophys. J.*, 75:2274–2291.
- [Kim et al., 1999] Kim, K., Neu, J. C., and Oster, G. F. (1999). Manybody forces between membrane inclusions: a new pattern-formation mechanism. *Europhys. Lett.*, 48:99–105.
- [Kloboucek et al., 1999] Kloboucek, A., Behrisch, A., Faix, J., and Sackmann, E. (1999). Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: A model membrane study. *Biophys. J.*, 77:2311–2328.
- [Koltover et al., 1999] Koltover, I., Rädler, J., Salditt, T., Rothschild, K., and Safinya, C. (1999). Phase Behavior and Interactions of the Membrane-Protein Bacteriorhodopsin. *Phys. Rev. Lett.*, 82:3184–3187.
- [Kooijman et al., 2003] Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., and Burger, K. N. J. (2003). Modulation of Membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, 4:162–174.
- [Koster et al., 2003] Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B., and Dogterom, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:15583–15588.
- [Kouyama et al., 1985] Kouyama, T., Bogomolni, R., and Stoeckenius, W. (1985). Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 48:201–208.
- [Kralj-Iglic et al., 2002] Kralj-Iglic, V., Iglic, A., Gomisecek, G., Sevsek, F., Arrigler, V., and Hägerstrand, H. (2002). Microtubes and nanotubes of phospholipid bilayer membrane. *J. Phys. A*, 35:1533–1549.
- [Kraus et al., 1995] Kraus, M., Seifert, U., and Lipowsky, R. (1995). Gravity-Induced shape Transformation of Vesicles. *Europhys. Lett.*, 32:431–436.
- [Krol et al., 1989] Krol, A. Y., Grinfeldt, M. G., Smilgavichus, A. D., and Levin, S. (1989). Local mechanical oscillations of the human erythrocyte surface. The effect of cross-linking reagents, hypotonicity and spectrin deficiency. *Tsitologiya*, 31:563–568.
- [Krol et al., 1990] Krol, A. Y., Grinfeldt, M. G., Levin, S. V., and Smilgavichus, A. D. (1990). Local mechanical oscillations of the cell surface within the range 0.2-30 Hz. *Eur. Biophys. J.*, 19:93–99.
- [Kuhl et al., 1994] Kuhl, T., Leckband, D., Lasic, D., and Israelachvili, J. (1994). Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained Ethylene-Oxide headgroups. *Biophys. J.*, 66:1479–1488.
- [Sunil Kumar and Madan, 1998] Sunil Kumar, P. and Madan, R. (1998). Shape Instabilities in the dynamics of a Two-component Fluid Membrane. *Phys. Rev. Lett.*, 80:2489–2492.
- [Sunil Kumar et al., 1999] Sunil Kumar, P. B., Gompper, G., and Lipowsky, R. (1999). Modulated phases in multicomponent fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 60:4610–4618.

- [Kummrow and Helfrich, 1991] Kummrow, M. and Helfrich, W. (1991). Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A*, 44:8356–8360.
- [Kühlbrand, 2000] Kühlbrand, W. (2000). Bacteriorhodopsin - the movie. *Nature*, 406:569–570.
- [Lacoste, 2004] Lacoste, D. (2004). (In preparation).
- [Landau and Lifschitz, 2000] Landau, L. D. and Lifschitz, E. (2000). *Theory of elasticity*, volume 7 of *Course of theoretical physics*. Butterworth Heinemann, Oxford, third edition.
- [Lanyi, 1997] Lanyi, J. (1997). Mechanism of ion transport across membranes. *J. Biol. Chem.*, 272:31209–31212.
- [Lasic and Templeton, 2000] Lasic, D. and Templeton, N. S., editors (2000). *Gene therapy: therapeutic mechanisms and strategies*. M. Dekker.
- [Leduc et al., 2004] Leduc, C., Campas, O., Bourel-Bonnet, L., Prost, J., Joanny, J. F., and Bassereau, P. (2004). (in preparation).
- [Lee and Wang, 1997] Lee, C. H. and Wang, J. (1997). Noninterferometric differential confocal microscopy with 2-nm depth resolution. *Optics Communications*, 135:233–237.
- [Lee et al., 1999] Lee, J., Petrov, P., and Döbereiner, H.-G. (1999). Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir*, 15:8543–8546.
- [Lee et al., 2001] Lee, C. H., Lin, W. C., and Wang, J. (2001). All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Phys. Rev. E*, 64:020901.
- [Leibler, 1986] Leibler, S. (1986). Curvature instability in membranes. *J. Phys.*, 47:507–516.
- [Leibler and Andelman, 1987] Leibler, S. and Andelman, D. (1987). Ordered and curved meso-structures in membranes and amphiphilic films. *J. Phys.*, 48:2013–2018.
- [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.
- [Levy et al., 1992] Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., and Rigaud, J.-L. (1992). Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1107:283–298.
- [Lipowsky, 1991] Lipowsky, R. (1991). The conformation of membranes. *Nature*, 349:475–481.
- [Lipowsky, 1993] Lipowsky, R. (1993). Domain-induced budding of vesicles. *Biophys. J.*, 64:1133–1138.
- [Lipowsky, 1995] Lipowsky, R. (1995). The morphology of lipid membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5:531–540.
- [Lipowsky, 1997] Lipowsky, R. (1997). Flexible membranes with anchored polymers. *Colloids and Surfaces A*, 128:255.
- [Lipowsky and Döbereiner, 1998] Lipowsky, R. and Döbereiner, H.-G. (1998). Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys. Lett.*, 43:219–225.

- [Lipowsky and Sackmann, 1995a] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors (1995). *From Cells to Vesicles*, volume 1A of *Structure and dynamics of membranes*. Elsevier sciences B.V.
- [Lipowsky and Sackmann, 1995b] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors (1995). *Generic and Specific Interactions*, volume 1B of *Structure and dynamics of membranes*. Elsevier sciences B.V.
- [Luecke et al., 1999] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J., and Lanyi, J. (1999). Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolutions. *Science*, 286:255–260.
- [Madigan et al., 1997] Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). *Biology of microorganisms*. Pernetice Hall International Inc., 8th edition.
- [Manneville et al., 1999] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Levy, D., and Prost, J. (1999). Activity of transmembranes proteins induces Magnification of shape fluctuations of lipid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 82:4356–4359.
- [Manneville, 1999] Manneville, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives*. PhD thesis, University Paris VII.
- [Manneville, 2000] Manneville, J.-B. (2000). Private Communication.
- [Manneville et al., 2000] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Levy, D., and Prost, J. (2000). Magnification of shape fluctuations of active giant unilamellar vesicles. In Luisi, P. and Walde, P., editors, *Giant vesicles*, volume 6, pages 351–359, Ascona (Switzerland). John Wiley and Sons, Inc. (Chichester).
- [Manneville et al., 2001] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Ramaswamy, S., and Prost, J. (2001). Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Phys. Rev. E*, 64:021908.
- [Martin and Lasic, 1995] Martin, F. and Lasic, D. (1995). *Stealth liposomes*. CRC Press.
- [Mathivet et al., 1996] Mathivet, L., Cribier, S., and Devaux, P. F. (1996). Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys. J.*, 70:1112–1121.
- [Menger and Keiper, 1998] Menger, F. and Keiper, J. S. (1998). Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Curr. Op. Chem. Biol.*, 2:726–732.
- [Merkel et al., 1989] Merkel, R., Sackmann, E., and Evans, E. (1989). Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers. *J. Phys. France*, 50:1535–1555.
- [Miao et al., 1994] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., and Döbereiner, H.-G. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E*, 49:5389–5407.
- [Milner and Safran, 1987] Milner, S. and Safran, S. (1987). Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles. *Phys. Rev. A*, 36:4371–4379.
- [Mitov et al., 1992] Mitov, M., Faucon, J., Méléard, P., and Bothorel, P. (1992). Thermal fluctuations of membranes. In Gokel, G. W., editor, *Advances in Supramolecular Chemistry*, volume 2, pages 93–139. Jai Press, Greenwich (Connecticut).

- [Mittelman et al., 1991] Mittelman, L., Levin, S., and Korenstein, R. (1991). Fast cell membrane displacements in B lymphocytes, modulation by dihydrocytochalasin B and colchicine. *FEBS*, 293:201–210.
- [Mittelman et al., 1994] Mittelman, L., Levin, S., Verchueren, H., De Baetselier, P., and Korenstein, R. (1994). Direct correlation between cell membrane fluctuations, cell filterability and the metastatic potential of lymphoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 203:899–906.
- [Mouritsen and Bloom, 1993] Mouritsen, O. and Bloom, M. (1993). Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22:145–171.
- [Mui et al., 1995] Mui, B. L.-S., Döbereiner, H.-G., Madden, T. D., and Cullis, P. R. (1995). Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 69:930–941.
- [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.*, 51:991–1002.
- [Méléard et al., 1990] Méléard, P., Mitov, M., Faucon, J., and Bothorel, P. (1990). Dynamics of Fluctuating Vesicles. *Europhys. Lett.*, 11:355–360.
- [Méléard et al., 1992] Méléard, P., Faucon, J., Mitov, M., 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., 1997] Méléard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M., Dufoucq, J., and Bothorel, P. (1997). Bending elasticities of model membranes: Influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, 72:2616–2629.
- [Méléard et al., 1998] Méléard, P., Gerbeaud, C., Bardusco, P., Jeandaine, N., Mitov, M., and Fernandez-Puente, L. (1998). Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie*, 80:401–413.
- [Nardi et al., 1998] Nardi, J., Bruinsma, R., and Sackmann, E. (1998). Adhesion induced reorganization of charged fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 58:6340–6354.
- [Nassey, 2000] Nassey, P. (2000). Private Communication.
- [Neuilly and CETAMA, 1998] Neuilly, M. and CETAMA (1998). *Modélisation et estimation des erreurs de mesure*. Lavoisier, Tec et Doc, Paris, second edition.
- [Oesterhelt and Tittor, 1989] Oesterhelt, D. and Tittor, J. (1989). Two pumps, one principle: light-driven ion transport in halobacteria. *TIBS*, 14:57–61.
- [Olbrich et al., 2000] Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., and Evans, E. (2000). Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. *Biophys. J.*, 79:321–327.
- [Peliti and Leibler, 1985] Peliti, L. and Leibler, L. (1985). Effects of thermal fluctuations on systems with small surface tension. *Phys. Rev. Lett.*, 54:1690–1693.
- [Peterson et al., 1992] Peterson, M., Strey, H., and Sackmann, E. (1992). Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes. *J. Phys. II France*, 2:1273–1285.

- [Petrov et al., 1999] Petrov, P., Lee, J., and Döbereiner, H.-G. (1999). Coupling chemical reactions to membrane curvature: A photochemical morphology switch. *Europhys. Lett.*, 48:435–441.
- [Polland et al., 1986] Polland, H.-J., Franz, M., Zinth, W., Kaiser, W., Kölling, E., and Oesterhelt, D. (1986). Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 49:651–662.
- [Pott and Méléard, 2002] Pott, T. and Méléard, P. (2002). The dynamics of vesicle thermal fluctuations is controlled by intermonolayer friction. *Europhys. Lett.*, 59:87–93.
- [Press et al., 1992] Press, W. H., Vetterling, W. T., Teukolsky, S. A., and Flannery, B. P. (1992). *Numerical recipes in C, the art of scientific computing*. Cambridge University Press, Cambridge, second 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.
- [Puech, 2003] Puech, P.-H. (2003). *Vésicules géantes décorées - adhésion et transport* -. PhD thesis, University Paris VI.
- [Pécéréaux et al., 2004] Pécéréaux, J., Döbereiner, H.-G., Prost, J., Joanny, J.-F., and Bassereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur. Phys. J. E*, (accepted).
- [Péré, 1994] Péré, J. (1994). *La microscopie*. Eric Périlleux, Nathan, Paris.
- [Radionov et al., 1996] Radionov, A., Kalaidzidis, I., and Kaulen, A. (1996). Complicated character of the M decay pH dependence in the D96N mutant is due to the two pathways of the M conversion. *FEBS Lett.*, 399:251–254.
- [Radionov and Kaulen, 1996] Radionov, A. and Kaulen, A. (1996). Two bacteriorhodopsin M intermediates differing in accessibility of the Schiff base for azide. *FEBS Lett.*, 387:122–126.
- [Ramaswamy, 1992] Ramaswamy, S. (1992). Equilibrium and non-equilibrium dynamics of the dilute lamellar phase. *Physica A*, 186:154–159.
- [Ramaswamy et al., 2000] Ramaswamy, S., Toner, J., and Prost, J. (2000). Nonequilibrium fluctuations, travelling waves and instabilities in active membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 84:3494–3497.
- [Ramaswamy and Rao, 2001] Ramaswamy, S. and Rao, M. (2001). The physics of active membranes. *C. R. Acad. Sci., Paris, IV b*, 2:817–839.
- [Rao and Sarasij, 2001] Rao, M. and Sarasij, R. (2001). Active Fusion and Fission Processes on a Fluid Membrane. *Phys. Rev. Lett.*, 87:128101.
- [Ratanabanangkoon et al., 2003] Ratanabanangkoon, P., Gropper, M., Merkel, R., Sackmann, E., and Gast, A. P. (2003). Mechanics of Streptavidin-Coated Giant Lipid Bilayer Vesicles: A Micropipet Study. *Langmuir*, 19:1054–1062.
- [Raucher and Sheetz, 1999] Raucher, D. and Sheetz, M. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys. J.*, 77:1992–2002.
- [Rawicz et al., 2000] Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys. J.*, 79:328–339.

- [Reinecke and Döbereiner, 2003] Reinecke, A. A. and Döbereiner, H.-G. (2003). Slow relaxation dynamics of tubular polymersomes after thermal quench. *Langmuir*, 19:605–608.
- [Rieu, 2002] Rieu, J.-P. (2002). Private Communication.
- [Rigaud et al., 1988] Rigaud, J.-L., Paternostre, M.-T., and Bluzat, A. (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27:2677–2688.
- [Rigaud et al., 1998] Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., and Lambert, O. (1998). Detergent removal by non-polar polystyrene beads: Application to membrane reconstitution and two-dimensional crystallization. *Eur. Biophys. J.*, 27:305–319.
- [Rigaud and Levy, 2003] Rigaud, J.-L. and Levy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Meth. Enzym.*, 372:65–86.
- [Rossier et al., 2003] Rossier, O., Cuvelier, D., Borghi, N., Puech, P. H., Derényi, I., Buguin, A., Nassoy, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Giant Vesicles under Flows: Extrusion and Retraction of Tubes. *Langmuir*, 19:575–584.
- [Roux et al., 1992] Roux, D., Nallet, F., Freyssingeas, E., Porte, G., Bassereau, P., Skouri, M., and Marignan, J. (1992). Excess area in fluctuating membranes. *Europhys. Lett.*, 17:575–581.
- [Roux et al., 2002] Roux, A., Capello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B., and Bassereau, P. (2002). A minimal system allowing tubulation using molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:5394–5399.
- [Roux, 2003] Roux, A. (2003). Private Communication.
- [Roux et al., 2004] Roux, A., Prost, J., Bassereau, P., and Goud, B. (2004). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. (submitted).
- [Rädler and Sackmann, 1993] Rädler, J. and Sackmann, E. (1993). Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France*, 3:727.
- [Rädler et al., 1995] Rädler, J. O., Feder, T., Strey, H., and Sackmann, E. (1995). Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E*, 51:4526–4536.
- [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.
- [Sackmann, 1989] Sackmann, E. (1989). Molecular and global structure and dynamics of membranes and lipid bilayers. *Canadian Journal of Physics*, 68:999–1010.
- [Sackmann, 1994] Sackmann, E. (1994). Membranes bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transition. *FEBS Letters*, 346:3–16.
- [Schneider et al., 1984] Schneider, M. B., Jenkins, J. T., and Webb, W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Phys.*, 45:1457–1472.

- [Seifert et al., 1991] Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991). Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A*, 44:1182–1202.
- [Seifert, 1991] Seifert, U. (1991). Vesicles of toroidal topology. *Phys. Rev. Lett.*, 66:2404–2407.
- [Seifert, 1993] Seifert, U. (1993). Curvature-induced lateral phase segregation in two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 70:1335–1338.
- [Seifert, 1995] Seifert, U. (1995). The concept of effective tension for fluctuating vesicles. *Zeitschrift für Physik B*, 97:299–309.
- [Seifert, 1997] Seifert, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics*, 46:13–137.
- [Seifert, 1999] Seifert, U. (1999). Hydrodynamics lift on bound vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 83:876–879.
- [Seigneuret and Rigaud, 1985] Seigneuret, M. and Rigaud, J.-L. (1985). Use of the 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 Movement in Large Bacteriorhodopsin Liposomes Reconstituted by Reverse-Phase Evaporation. 1. Factors Governing Passive Proton Permeability of the Membrane. *Biochemistry*, 25:6716–6722.
- [Sens and Safran, 2000] Sens, P. and Safran, S. (2000). Inclusions induced phase separation in mixed lipid film. *Eur. Phys. J. E*, 1:237–248.
- [Shechter, 1993] Shechter, E. (1993). *Biochimie et biophysique des membranes*. Masson, 2ème édition.
- [Shrager et al., 1995] Shrager, R., Hendler, R., and Bose, S. (1995). The ability of actinic light to modify the bacteriorhodopsin photocycle. Heterogeneity and/or photocooperativity? *Eur. J. Biochem.*, 229:589–595.
- [Solon et al., 2004] Solon, J., Pécéréaux, J., Prost, J., Joanny, J. F., and Bassereau, P. (2004). Giant instabilities induced either by fusion or adhesion of Small Unilamellar Vesicles on a Giant Unilamellar Vesicle. (in preparation).
- [Solon, 2004] Solon, J. (2004). *Intéractions entre membranes lipidiques chargées : instabilités, déformations et mouvement*. PhD thesis, University Paris VI.
- [Song and Waugh, 1993] Song, J. and Waugh, R. (1993). Bending rigidity of SOPC membranes containing cholesterol. *Biophys. J.*, 64:1967–1970.
- [Sperotto and Mouritsen, 1991] Sperotto, M. M. and Mouritsen, O. (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. (1993). Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two-component lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.*, 22:323–328.
- [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.

- [Subramaniam et al., 1999] Subramaniam, S., Lindahl, M., Bullough, P., Faruqi, A., Tittor, J., Oesterhelt, D., Brown, L., Lanyi, J., and Henderson, R. (1999). Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Mol. Biol.*, 287:145–161.
- [Subramaniam, 1999] Subramaniam, S. (1999). The structure of bacteriorhodopsin: an emerging consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:462–468.
- [Subramaniam and Henderson, 2000] Subramaniam, S. and Henderson, R. (2000). Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature*, 406:653–657.
- [Svetina, 1982] Svetina, S. (1982). Membrane bending energy in relation to bilayer couples concept of red blood cell shape transformations. *J. Theor. Biol.*, 94:13–23.
- [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:S86–S90.
- [Svetina and Zeks, 1985] Svetina, S. and Zeks, B. (1985). Bilayer couple as a possible mechanism of biological shape formation. *Biochim. Biophys. Acta*, 44:979–986.
- [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.
- [Toyoshima et al., 2000] Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of the sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405:647–655.
- [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. U.S.A.*, 94:5045–5049.
- [Veatch and Keller, 2002] Veatch, S. L. and Keller, S. L. (2002). Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys. Rev. Lett.*, 89:268101.
- [Waharte, 2002] Waharte, F. (2002). *Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des entérocytes : étude par FRAP à deux photons*. PhD thesis, University Paris XI.
- [Waugh, 1982] Waugh, R. (1982). Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. *Biophys. J.*, 38:19–37.
- [Weast, 1988] Weast, R. C., editor (1988). *Handbook of chemistry and physics*. CRC Press, Boca Raton, 69th edition.
- [Westerhoff et al., 1981] Westerhoff, H., Hellingwerf, K., Arents, J., Scholte, B., and van Dam, K. (1981). Mosaic nonequilibrium thermodynamics describes biological energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:3554–3558.
- [Wick et al., 1996] Wick, R., Angelova, M., Walde, P., and Luisi, P. (1996). Microinjection into giant vesicles and light microscopy investigation of enzyme-mediated vesicle transformations. *Chemistry and Biology*, 3:105–111.
- [Wiegand et al., 1998] Wiegand, G., Neumaier, K., 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.

- [Wilson and Sheppard, 1981] Wilson, T. and Sheppard, C. (1981). The halo effect of image processing by spacial frequency filtering. *Optik*, 59:19–23.
- [Wintz et al., 1996] Wintz, W., Döbereiner, H.-G., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, 33:403–408.
- [Yamashita et al., 2002] Yamashita, Y., Oka, M., Tanaka, T., and Yamazaki, M. (2002). A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them. *Biochim. Biophys. Acta*, 1561:129–134.
- [Yeung and Evans, 1995] Yeung, A. and Evans, E. (1995). Unexpected dynamics in shape fluctuations of bilayer vesicles. *J. Phys. II*, 5:1501–1523.
- [Zhelev, 1998] Zhelev, D. (1998). Material property characteristics for lipid bilayers containing lysolipid. *Biophys. J.*, 75:321–330.
- [Zhong-can, 1990] Zhong-can, O.-Y. (1990). Anchor ring-vesicle membranes. *Phys. Rev. A*, 41:4517–4520.

Résumé

Nous avons développé une nouvelle technique de reconnaissance de contours de vésicules lipidiques géantes en microscopie à contraste de phase permettant une analyse en temps réel avec une très bonne précision. Nous obtenons ainsi le spectre de fluctuation d'une vésicule et nous avons développé le formalisme nécessaire à une comparaison avec les théories développées sur des membranes planes. Nous avons appliqué notre technique à l'analyse de vésicules purement lipidiques et nous mesuré le spectre de fluctuations. Les modules de courbure déduits correspondent aux valeurs de la littérature. Cette technique nous a aussi permis d'étudier deux types de membranes hors équilibre: d'une part des liposomes contenant de la bactériorhodopsine où nos résultats ne s'interprètent pas avec la théorie actuelle des membranes actives; notre technique a été aussi appliquée à des membranes en présence d'apport de lipides, et nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'une tension négative.

Mots-clefs : Microscopie à contraste de phase - Reconnaissance de Contours - Spectre de fluctuations - Vésicules lipidiques géantes - Membranes fluctuantes - Membranes hors-équilibre - Bactériorhodopsine

Abstract

A new method of contours analysis has been developed using phase contrast microscopy on giant lipids vesicles. It allows an accurate detection in real time. We obtain fluctuations spectra and we have developed analysis to compare them with theory for planar membranes. Our method was applied to pure lipids vesicles and we obtain good agreement with theoretical predictions for fluctuations spectra. The bending rigidities deduced correspond to those of the litterature. We also study two types of non-equilibrium membranes: liposomes containing bacteriorhodopsin; our results cannot be explained by actual active membranes theory; membrane with external source of lipids were also studied, and we find a negative tension regime

Key-words: Phase contrast microscopy - Contour Analysis - Fluctuation spectrum - Giant lipids vesicles - Fluctuating membranes - Out-of-equilibrium membranes - Bacteriorhodopsin

Laboratoire Physico-Chimie Curie, UMR 168 CNRS/Institut Curie
Section de recherche, Institut Curie
11 rue Pierre et Marie Curie
75231 Paris cedex 5
FRANCE