

Effet de l'encombrement des protéines sur la diffusion des lipides et des protéines membranaires

Kodjo Mawoussi

▶ **To cite this version:**

Kodjo Mawoussi. Effet de l'encombrement des protéines sur la diffusion des lipides et des protéines membranaires. Biophysique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066541 . tel-02420527

HAL Id: tel-02420527
https://theses.hal.science/tel-02420527

Submitted on 20 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie.

Ecole doctorale : Physique en Ile de France (EDPIF)

UMR 168 / Equipe Bassereau

Sujet de la thèse : Effet de l'encombrement des protéines sur la diffusion des lipides et des protéines membranaires

Par Kodjo MAWOUSSI

Thèse de doctorat de Biophysique

Dirigée par Patricia BASSEREAU et co-dirigée par Stéphanie MANGENOT

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Mme Marianne RENNER	Présidente
Mme Patricia BASSEREAU	Directrice de thèse
Mme Stéphanie MANGENOT	Invité
M. Frédéric JOUBERT	Rapporteur
M. Thierry CHARITAT	Rapporteur
M. David TARESTE	Examinateur

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire physico-chimie Curie sous la direction de Patricia Bassereau et la codirection de Stéphanie MANGENOT. Je remercie donc Patricia BASSEREAU de m'avoir accueilli au sein de son équipe et Stéphanie MANGENOT pour son encadrement.

Je tiens à remercier Thierry CHARRITAT et Frédérique JOUBERT d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir participé à mon jury.

Je remercie également les autres membres du jury avec lesquels j'ai interagi: Marianne RENNER qui a beaucoup contribué à la mise au point du programme de tracking au cours des années avec moi et qui a accepté de présider mon jury et David TARESTE qui faisait partie de mon comité de thèse et qui a accepté d'examiner mon travail.

Je remercie infiniment Jean François JOANNY mon parrain parisien pour son enthousiasme, sa bonne humeur et son expertise scientifique hors norme. C'est lui qui m'a donné le goût de la Biophysique à l'Institut Africain des Sciences Mathématiques de Mbour au Sénégal (AIMS-Sénégal). C'est aussi grâce à lui que j'ai connu Patricia BASSEREAU et Stéphanie MANGENOT. Je lui dois beaucoup de chose que les mots ne peuvent pas exprimer.

Je tiens aussi sincèrement à exprimer ma profonde reconnaissance à Patricia BASSEREAU de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir donné tous les moyens pour réaliser ce travail dans des conditions excellentes. Je la remercie également pour m'avoir donné cette opportunité sans précédent dans ma vie et d'avoir été toujours disponible à m'écouter et à me proposer des idées absolument ingénieuses en vue de la réalisation de ce magnifique projet de recherche. Je la remercie également pour nos échanges scientifiquement riches, sa pédagogie hors morne et pour ses bonnes pressions les matins dans les couloirs « avec des phrases genres alors…ça a marché…ça devrait marcher ☺ ». Je sais qu'il y a beaucoup de chef dans le monde qui sont très pédagogues mais pour moi Patricia serait en avant-première si on me donnait l'occasion de les classer par ordre de mérite. Je la remercie également pour son enthousiasme, dynamisme et efficacité. Je la remercie également pour ses conseils précieux lors de mes soucis en fin de 1ère année de thèse, son soutien au quotidien et ses aides multiples sans condition. Patricia est « plus qu'une mère » pour moi.

Je tiens également sincèrement à exprimer ma profonde reconnaissance à Stéphanie MANGENOT pour avoir codirigé mon travail. Je la remercie également pour sa disponibilité et pour tout ce qui concerne les approches expérimentales de même que nos échanges scientifiquement riches au quotidien. Je la remercie également pour ses précieux conseils, son dynamisme et son efficacité.

Je remercie aussi F Quemeneur, pour m'avoir initié au projet. François est l'un des experts de Single Particle Traching. Je le remercie de ses multiples aides que ce soit au labo ou par téléphone après son post doc. François, m'a initié à la rigueur scientifique. Il m'a appris à faire des GUVs, à mesurer la perméabilité de l'eau à travers les AQP0 pendant mon stage de Master 2 au moment où il réalisait son post-doc auprès de Patricia BASSEREAU et à la technique de SPT quand il réalisait son MBA à Lyon et surtout au programme matlab d'analyse qu'il a développé en amont de celui de Marianne Reiner. Ils m'ont rendu la vie plus facile avec leur programme sans lequel je n'aurais pas pu sans doute analyser mes données et

par conséquent mener à bien mon projet de thèse. J'apprécie particulièrement François pour son amitié et ses échanges scientifiques de haut niveau.

Je remercie également Nicolas Destainville pour la théorie, les membres de l'équipe Bassereau (les anciens Mathias, Coline, David, Alice, Mijo, Senthyl, Maryam, Thibaut, Ajay, Feng, Alicia, Michael, Oleg, Joanna, Alexandre, Nicolas et Julien et un récent collaborateur : Guillermo). Vous êtes tous si humains que c'est rare. Je tiens particulièrement à remercier Thibaut pour son aide avec la microscopie, son expertise scientifique de haut niveau (je me demande comment il fait pour tout connaitre ☺ ; en tout cas tu vas me manquer … et surtout pour ses blagues dans les soirées ADIC « Kodjo tu es si noir que personne ne te voit » ☺ et Julien « juju » mon conseillé souterrain ☺ pour sa bonne humeur, pour les discussions au quotidien et surtout pour son expertise scientifique de haut niveau. « Juju » tu vas beaucoup me manquer ☺. Puis le soutient au cours des années de l'AIV pour mon master, l'IPGG qui a payé mon master et particulièrement le président de l'UPMC qui a permis le financement de ma thèse.

Je remercie l'ensemble des personnes du laboratoire UMR168 pour leur aide et le temps qu'ils m'ont accordé. Notamment les personnes du service administratif : Karen, Agnès, Françoise, Laurence, Giulia, Christelle et Reza.

Je remercie également Brigitte à l'accueil pour son sourire matinal et sa gentillesse.

Je remercie également mes voisins de Bureau « Rodrigo, Alexandre, Thann, Jens et Valentina. Et tout particulièrement Rodrigo et Alexandre pour leur bonne humeur.

Je remercie mes colocataires Louise (la maman qui râle beaucoup ☺) Maissa (le grand programmeur), Jeoffrey (l'ivoirien qui voit ☺) et ma propriétaire Mme BUI pour leur soutien, générosité et les discussions au quotidien. Ils sont si humains que c'est rare.

Enfin, je tiens à remercier infiniment toute ma famille : (ma mère que j'adore ☺, ma grande sœur adorée ☺ et mes 3 frères que j'aime beaucoup. J'ai presque sacrifié une partie de ma vie pour leur survie et j'en suis fier. J'aime tout particulièrement ma mère parce qu'elle s'est sacrifiée pour moi notamment lors du décès de mon père en 1999. Tout d'abord elle a dû vendre ses bijoux précieux afin que je puisse payer mes frais de scolarité de la classe de seconde. Ensuite elle m'a appris à Aimer et à Donner sans attendre forcement de retour. Enfin elle m'a surtout contaminé par son sourire et maintenant je ne peux vivre sans sourire. Et cela me procure beaucoup de bien. Pour tout cela – « Cette thèse lui est dédiée »

Sommaire

Remerciements 2
I Introduction 7
II Organisation et dynamique dans les membranes modèles et biologiques 9
II.1 Introduction sur les membranes 9
II.2 Qu'est-ce qu'une membrane ? 9
II.2.1 D'un point de vue biologique 9
II.2.1.1 La membrane cellulaire 9
II.2.1.2 Lipides et organisation dans les membranes 11
II.2.1.3 Les protéines membranaires 15
II.2.1.4 Propriétés physico-chimiques de la bicouche 21
II.2.1.5 Inhomogénéités latérales et "radeaux lipidiques" dans les membranes : 22
II.2.1.6 Modèle de « corrals » ou domaines délimités par le cytosquelette 27
II.2.1.7 Modèle « d'agrégats dynamiques » 28
II.2.2 Introduction au mouvement Brownien 33
II.2.2.1 Explication du mouvement Brownien avant Einstein 34
II.2.2.2 Explication théorique par Albert Einstein 35
II.2.3 Théorie de la diffusion des protéines dans des membranes : vers un modèle physique 36
II.2.3.1 Le modèle de Saffman et M. Delbrück inspiré par Singer et Nicolson 36
II.2.3.2 Diffusion et modèle de Singer et Nicolson modifié pour tenir compte de l'organisation des membranes 38
II.2.3.3 Principaux facteurs géométriques, mécaniques et chimiques qui affectent la dynamique des protéines 39
II.2.3.4 Modèles théoriques post- SD 41
II.2.3.5 Diffusion dans un environnement encombré en protéines 45
II.2.4 Etat de l'art expérimental des mesures de diffusion à ce jour 51
II.2.4.1 Comment mesure-t-on le coefficient de diffusion des lipides et des protéines (dans des systèmes modèles) ?. 51
II.2.5 Motivation : Objectif de ma thèse 55
III Protéines étudiées 57
III.1 Premiers essais : l'aquaporine 0 57
III.2 La bactériorhodopsine 57
III.2.1 Structure de la BR 59
III.2.2 Fonction de la BR 60
IV Matériels et Méthodes 65
IV.1 Production de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) contenant la Bactériorhodopsine. 65
IV.1.1 Marquage de la Bactériorhodopsine avec de la Biotine 65
IV.1.2 Reconstitution de la BR dans des petits liposomes 66
IV.1.2.1 Principe de la méthode 66
IV.1.2.2 Solubilisation de la BR 67
IV.1.2.3 Reconstitution en liposomes 67
IV.1.2.4 Mesure de la concentration de Bactériorhodopsine dans nos protéoliposomes de stock 68
IV.1.3 Electroformation des vésicules unilamellaires géantes 69
IV.2 Montage expérimental 71
IV.2.1 Microscope optique 71
IV.2.2 Chambre d'observation 72
IV.2.2.1 Fabrication des micropipettes 73
IV.2.2.2 Marquage de quelques BRs par des nanoparticules fluorescentes (QDs) 73

IV.2.2.3 Tension latérale de la membrane : 75
IV.2.3 Expériences de suivi de particules uniques (SPT) 76
IV.2.3.1 Acquisition des données 77
IV.2.3.2 Choix de la zone d'acquisition des données - ROI 78
IV.2.3.3 Analyse des données 79
IV.2.4 Protocole expérimental 87
IV.2.4.1 Calcul de la fraction surfacique occupée par les protéines 87
IV.2.4.2 Choix de la protéine 87
IV.2.4.3 Marquage par des nanoparticules fluorescentes (QDs) 88
IV.2.4.4 Quantification de la densité de protéines dans des GUVs 89
V Résultats 93
V.1 Expériences de contrôle : diffusion latérale de lipides (DOPC) 93
V.1.1 Diffusion latérale des lipides en l'absence de protéines 93
V.1.2 Discussion avec la comparaison avec des valeurs des littératures 96
V.2 Effet de la densité de la Bactériorhodopsine BR sur la diffusion de DOPC 100
V.2.1 Résultats 100
V.2.2 Comparaison avec les modèles théoriques 103
V.3 Effet de la densité de la Bactériorhodopsine sur sa propre diffusion 105
V.3.1 Résultats 105
V.3.2 Comparaison avec les modèles théoriques 108
V.3.3 Origine de la déviation 110
V.3.4 Effet de la présence d'agrégats protéiques sur leur coefficient de diffusion (Modèle de Nicolas Destainville). 111
V.3.5 Discussion - Conclusion 115
VI Conclusion générale 117
VII Bibliographie 119
Annexes 131
Annexe 1: Abréviations 131
Table des illustrations 132
Table des tableaux 142

I Introduction

Dans les cellules, les membranes jouent un rôle extrêmement important. Elles séparent l'intérieur de la cellule de l'extérieur, mais elles permettent aussi la séparation des organelles entre eux au sein de la cellule. Les membranes des différents compartiments cellulaires ainsi que de la membrane plasmique qui entoure la cellule se distinguent par des compositions lipidiques très distinctes, par différentes asymétries entre les feuillets de la bicouche ou le nombre de bicouches qui les composent (par exemple les membranes nucléaires ou mitochondriales comportent 2 bicouches). Le modèle de l'organisation membranaire a aussi beaucoup évolué depuis le modèle initial de Singer et Nicolson de mosaïque fluide (Singer and Nicolson 1972). A cette époque, la membrane était considérée comme une matrice fluide bidimensionnelle dans laquelle diffusent des protéines membranaires isolées. Ce modèle permettait de rendre compte d'un certain nombre de propriétés des membranes cellulaires telles que leur comportement en fonction de la température ou la diffusion des protéines. Mais, avec le temps et la progression des techniques de microscopie, de biologie cellulaire, de mesure de dynamique des protéines et de l'analyse de la composition des membranes, de nouveaux modèles plus élaborés de la membrane plasmique des cellules eucaryotes sont apparus; ils prennent en compte la présence de domaines lipidiques (rafts/radeaux) auxquels sont associées certaines protéines membranaires, la formation d'agrégats (clusters) de protéines, le confinement plus ou moins partiel dans des zones de la membrane délimitées par le cytosquelette ("barrière et piquets"), ainsi que la quantité importante de protéines membranaires. En effet, la fraction surfacique de protéines peut atteindre 50% à 70% suivant la nature des membranes (Alberts et al. 2002). L'encombrement protéique ("crowding" en anglais) y est donc très important et on s'attend intuitivement à ce qu'il influence directement la mobilité latérale des protéines et des lipides qui composent les membranes. Différents modèles théoriques ou numériques ont été développés pour calculer l'effet de la fraction surfacique d'inclusions membranaires ou d'obstacles sur la diffusion de traceurs, e.g. ces inclusions ou les lipides. Ils prévoient effectivement une réduction de la diffusion des traceurs et différentes lois de variation. Expérimentalement, cet effet doit être étudié sur des membranes modèles où des protéines membranaires sont reconstituées. Jusqu'à présent, les mesures de diffusion latérale de protéines et/ou de lipides ont été réalisées soit sur des membranes très denses en protéines (Peters and Cherry 1982) où les modèles ne s'appliquent pas, ou très mal, ou à faible densité de protéines (Ramadurai et al. 2009). **Le but de cette thèse est d'étudier expérimentalement le rôle de l'encombrement en protéines sur la diffusion des lipides et des protéines**.

Les "Vésicules Unilamellaires Géantes" (GUVs) sont un système de membrane modèle très utilisé pour mimer les membranes cellulaires (Morales-Penningston et al. 2010) (Lagny and Bassereau 2015). Les dimensions caractéristiques de ces vésicules, de l'ordre du micron présentent une taille similaire à celle des cellules. La composition lipidique peut être contrôlée et depuis une vingtaine d'années différentes méthodes de reconstitution de protéines membranaires ont progressivement été mises au point qui permettent maintenant de préparer de façon assez systématique des GUVs avec des densités variables de protéines (Jørgensen et al. 2017) (Garten et al. 2015) dans des gammes assez larges. Ces vésicules présentent l'avantage de pouvoir être micromanipulées à l'aide de micropipettes et sont donc un système de choix pour étudier les paramètres macroscopiques physiques des membranes biologiques tels que la tension latérale, le module d'élasticité et de compressibilité de la membrane et le coefficient de diffusion latérale de traceurs (lipides ou protéines) dans la membrane. Dans la section V nous présenterons nos résultats expérimentaux et nous les discuterons en relation avec les différentes théories existantes.

Dans ce travail, nous avons donc choisi de reconstituer la pompe à protons Bactériorhodopsine (BR) dans des GUVs jusqu'à des densités de surface plus élevées que dans (Ramadurai et al. 2009), pratiquement environ 20 %. Nous avons utilisé une méthode de suivi de particules uniques (SPT) pour détecter les trajectoires de lipides et de la BR marqués avec des quantum dots. En mesurant le coefficient de diffusion des protéines et des lipides en fonction de la fraction de surface totale (Φ) de BR reconstituée, nous avons ainsi pu montrer que le coefficient de diffusion D des lipides diminuait linéairement avec la densité de protéines, en accord global avec les différents modèles existants. Par contre, le coefficient de diffusion de la BR décroit plus rapidement que ne le prévoient les théories qui ne considèrent pas la possibilité de formation d'agrégats protéiques. De fait, il existe de nombreuses interactions d'origine physique qui peuvent donner lieu à la formation d'agrégats protéiques de taille finie dans les membranes (Reynwar et al. 2007) (Destainville 2008) (Hanulová and Weiss 2012), et bien sûr des interactions directes protéines-protéines liées à leur structure. On s'attend à ce que la densité de clusters et éventuellement leur taille augmentent avec la fraction de protéines dans les membranes (Destainville 2008). Nous avons alors montré que la variation du coefficient de diffusion de la BR est en accord avec un modèle de N. Destainville, prenant en compte la présence de trimères de BR dont le nombre augmente avec la concentration. Ces résultats de dynamique sont en bon accord avec des observations de cryo-microscopie électronique qui avaient mis en évidence ces trimères de BR dans des protéo-liposomes (Gulik-Krzywicki et al. 1987).

Le plan de ce manuscrit est le suivant. Nous commencerons par présenter dans le **chapitre 2** l'état de l'art sur l'organisation et la dynamique des membranes biologiques et artificielles. Puis, nous introduirons les différentes méthodes utilisées pour mesurer des coefficients de diffusion ainsi que les modèles théoriques existants et les quelques mesures publiées sur l'effet de l'encombrement sur la diffusion de traceurs membranaires. Dans le **chapitre 3**, nous présenterons la protéine qui a été utilisée pour notre étude : la bactériorhodopsine. Le matériel et les méthodes utilisées seront présentés dans le **chapitre 4**. Et enfin dans le **chapitre 5**, nous présenterons nos différents résultats expérimentaux et nous les discuterons à la lumière des différentes théories existantes.

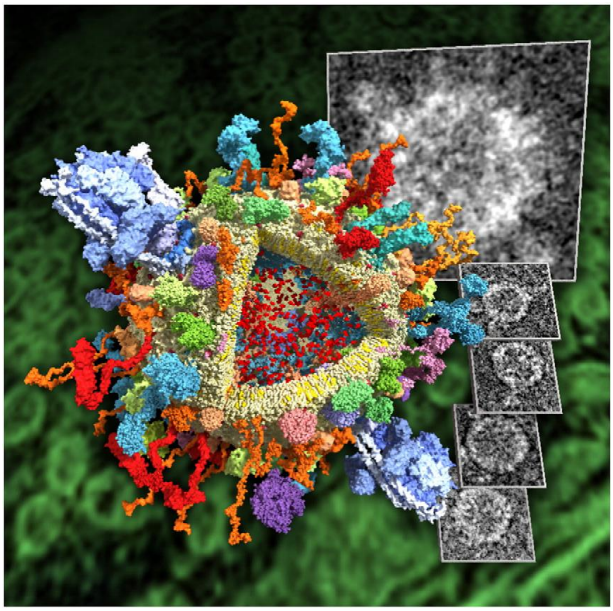


Illustration de l'encombrement membranaire: modèle moléculaire d'une vésicule synaptique (Metzler et al. 2016)

II Organisation et dynamique dans les membranes modèles et biologiques

II.1 Introduction sur les membranes

Les membranes jouent un rôle important dans le fonctionnement de la cellule. Elles isolent l'intérieur de la cellule de l'extérieur de manière passive à cause de leur perméabilité limitée aux ions ou aux petites molécules neutres. Pour permettre le transport de part et d'autre de la membrane, il existe alors une variété de protéines transmembranaires qui permettent le passage des ions ou d'autres petites molécules. Dans ce chapitre introductif, le terme « membranes » se réfèrent soit à des membranes biologiques, soit à des membranes artificielles composées de molécules amphiphiles appelées lipides qui s'auto-assemblent spontanément comme décrit au § II.2.1.2.1.

La découverte de la structure en bicouche lipidique de la membrane cellulaire remonte à 1925. Deux biologistes Gorter et Grendel (Gorter and Grendel 1925) découvrent que la surface des lipides des membrane de globule rouge est égale à deux fois la surface des globules rouges. Ils proposent donc l'hypothèse que les lipides sont organisés en bicouche de lipides au sein de la membrane. Quelques années plus tard, les protéines sont entrées dans la description de la membrane. Cependant, leur localisation et distribution n'étaient alors pas du tout bien comprises et suscitaient beaucoup de débats entre biologistes. Il a fallu attendre la première moitié du 20ème siècle pour que les observations de microscopie électronique consolident l'hypothèse d'une organisation des lipides en bicouche, révèlent l'asymétrie de la membrane et suggèrent la présence de structures globulaires, composées de protéines (Roger and George G 1980).
Un premier modèle de membrane a été proposé par Singer et Nicolson en 1972. Dans ce modèle la membrane est considérée comme un fluide visqueux à deux dimensions dans lequel peu de protéines isolées diffusaient librement (Singer and Nicolson 1972). La microscopie électronique a permis de montrer que les membranes étaient très fortement encombrées en protéines membranaires (Stryer 1997). A la fin des années 1990, il a été proposé l'existence de micro domaines, enrichis en cholestérol, résistant aux détergents doux et riches en protéines membranaires. Ces microdomaines sont appelés radeaux lipidiques (raft en anglais) (Simons and Ikonen 1997). Le modèle initial de Singer et Nicolson a dû être révisé pour prendre en compte ces nouveaux effets (Engelman 2005). Ainsi la membrane que nous allons décrire ci-dessous est un système très dynamique et contient une multitude de lipides et de protéines membranaires.

II.2 Qu'est-ce qu'une membrane ?

II.2.1 D'un point de vue biologique

II.2.1.1 **La membrane cellulaire**

La cellule est la plus petite unité structurale et fonctionnelle de tous les êtres vivants. À l'intérieur, elle est constituée de nombreux compartiments appelés "organelles" tels que le noyau, les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les lysosomes, endosomes et les peroxysomes (voir Figure 1).

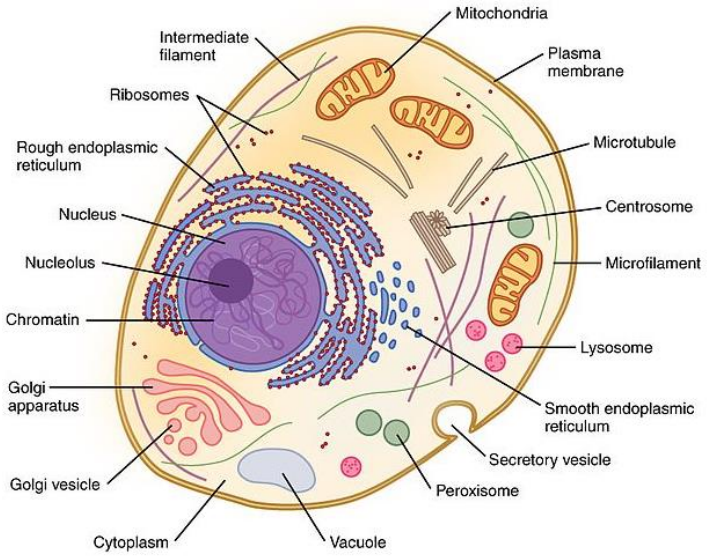


Figure 1 : Schéma d'une cellule animale montrant la membrane plasmique, le cytoplasme et différentes organelles au sein de la cellule : noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, peroxysomes et endosomes.
https://fr.wikiversity.org/wiki/Structure_des_cellules_eucaryotes/La_cellule_eucaryote)

Toutes ces organelles sont séparées de l'environnement externe par des membranes. La membrane qui entoure les cellules est appelée membrane plasmique. Elle joue un rôle très important car elle isole l'intérieur de la cellule de l'extérieur de manière passive en raison de la perméabilité limitée de la membrane aux ions ou aux petites molécules. Cependant, la membrane est constituée de différents types de protéines transmembranaires qui jouent le rôle de transporteurs actifs. Ces protéines peuvent laisser passer des ions ou d'autres molécules de façon contrôlée. C'est le cas par exemple des canaux ioniques ou des pompes ioniques qui permettent de maintenir des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique (Cf. la section II.2.1.3). La membrane plasmique contient une large variété de lipides, de protéines membranaires et de glycoprotéines. De plus, elle est liée au cortex d'actine qui constitue une part importante du cytosquelette cellulaire et qui offre à la cellule l'essentiel de ses propriétés architecturales et mécaniques (voir Figure 2). Les membranes qui entourent les organelles présentent différentes compositions et ne sont pas nécessairement couplées aux filaments du cytosquelette.

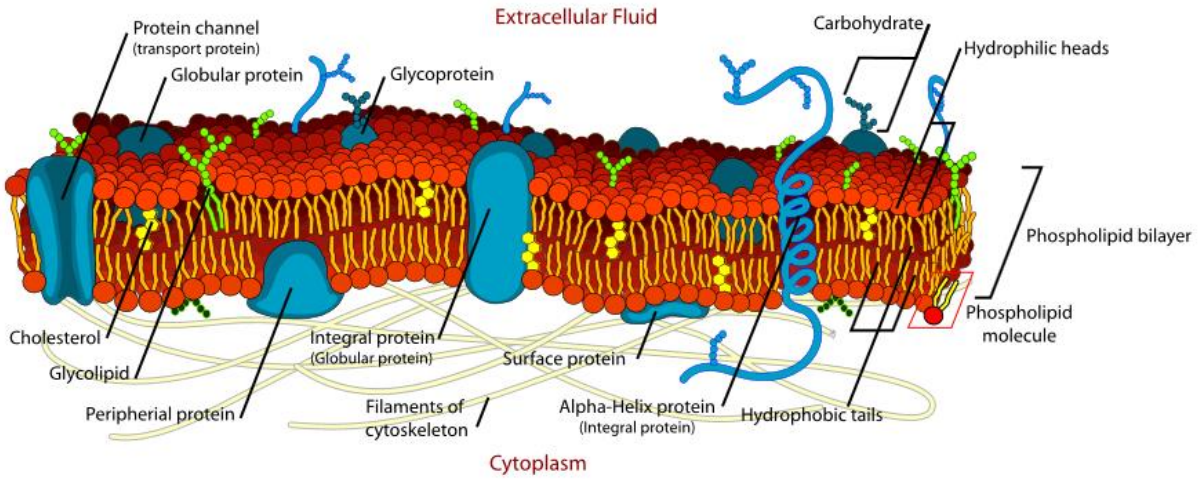


Figure 2 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire et de ses principaux composants: la bicouche lipidique et certaines protéines transmembranaires. (Source : Wikipédia).

Comme on peut le voir sur la Figure 2, la base essentielle des membranes biologiques est la bicouche lipidique dont les lipides constituent la matrice. Dans la section suivante nous allons décrire dans un premier temps les différents types de lipides et leur organisation en bicouche lipidique. Ensuite nous introduirons les protéines membranaires. Enfin nous terminerons par les propriétés physico-chimiques et mécaniques des bicouches.

II.2.1.2 **Lipides et organisation dans les membranes**

II.2.1.2.1 Lipides

Les lipides sont des molécules amphiphiles qui sont constituées d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. A l'interface entre un milieu aqueux et un milieu non-aqueux, ils s'auto-organisent de façon à présenter leurs têtes hydrophiles vers l'eau et regrouper leurs queues hydrophobes hors du contact avec l'eau. Comme je le décrirai dans la section suivante, la plupart des lipides s'organisent en bicouches dans un environnement aqueux de sorte que les queues hydrophobes soient protégées de l'eau par les têtes hydrophiles comme le montre la Figure 3. En fonction des lipides, la tête polaire peut être zwitterionique (possédant une charge positive et une charge négative), négativement chargée (acide) ou positivement chargée (basique); cependant, il n'existe pas de lipides naturels chargés positivement et les lipides des membranes cellulaires sont soit zwitterioniques soit acides à pH physiologique. La partie hydrophobe est constituée d'acides gras ayant une longueur et un nombre d'insaturations variable. Grâce à cette combinatoire entre la diversité des têtes et des chaînes, il existe plus de 20 000 lipides différents (voir the LIPID MAPS Structure Database (LMSD)). Dans les cellules eucaryotes, plus de 1000 lipides différents ont été identifiés (Van Meer et al. 2008).

En fonction de la longueur et du nombre d'insaturations de la queue, les lipides peuvent adopter différentes organisations en fonction de la température, tout comme les acides gras libres ont une transition de phase « gel-liquide » à une température de fusion (T_M). Au-dessus de T_M, les lipides dans la membrane présentent une forte liberté conformationnelle et donc une forte diffusion latérale et translationnelle. La membrane se comporte alors comme un liquide bi-dimensionnel. D'autre part, en-dessous de T_M, la diffusion est ralentie de 3 ordres de grandeur, les chaînes sont étirées et la bicouche est plus épaisse. Cette phase est appelée phase "solide ordonnée" (s_0) ou "gel", (voir dans (Van Meer et al. 2008) pour plus de détail). En général, plus les chaines d'acides gras sont longues et saturées plus le point de fusion est élevé (Cevc 1991). Toutefois, la tête hydrophile influence aussi la transition de phase des lipides (Cevc 1987).

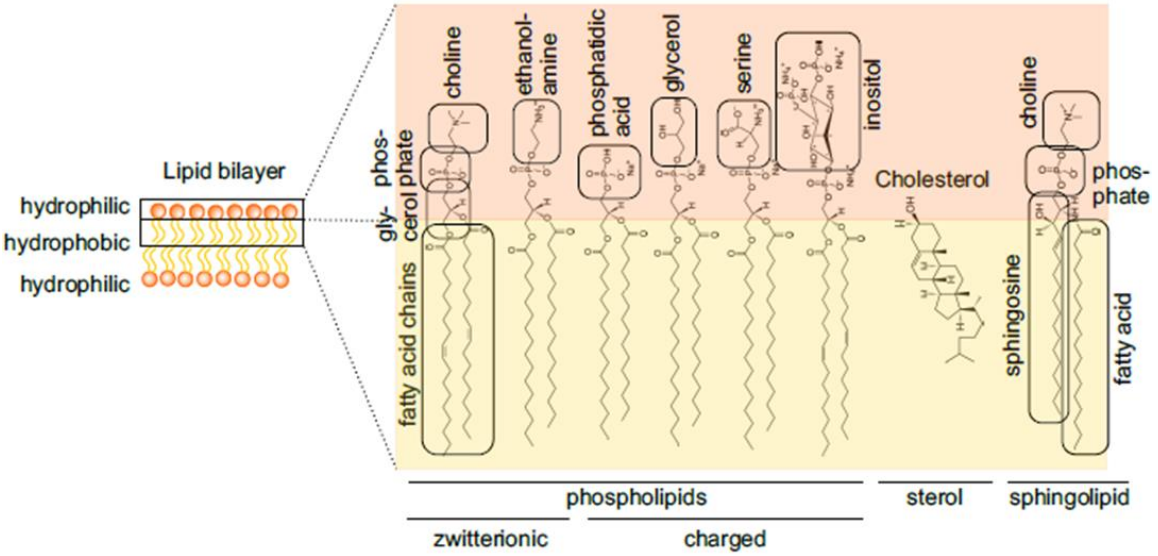


Figure 3 : Bicouche lipidique et structure des lipides les plus communs dans les membranes cellulaires. Les charges correspondent à un pH physiologique de 7,4. Les structures proviennent de https://www.avantilipids.com

Dans la membrane plasmique cellulaire, les lipides les plus abondants sont les phosphoglycérides (environ 75%), les sphingolipides (environ 25%); le cholestérol est présent à un rapport équimolaire (1:1) avec le reste des autres lipides; les lipides de signalisation comme le céramide ou les phosphoinositides représentent moins de 1% des lipides (Van Meer et al. 2008). Il faut noter cependant que la composition lipidique varie énormément entre les différentes membranes cellulaires. En particulier, la membrane plasmique est très enrichie en cholestérol et en sphingolipides par rapport aux membranes du Golgi ou du réticulum endoplasmique. De plus, la composition des 2 feuillets lipidiques est très asymétrique (Devaux and Morris 2004), (Smith and Oldfield 1984): les sphingolipides et les glycolipides sont exclusivement sur le feuillet externe alors que les lipides chargés sont sur le feuillet interne (Van Meer et al. 2008).

Phosphoglycérides Ils sont constitués d'une part d'une tête polaire avec un groupement phosphate (négativement chargé) et un résidu fonctionnel et d'autre part, de deux chaînes d'acides gras, connectées par un groupement glycérol (Figure 3). Les acides gras constituent la fraction hydrophobe des lipides. Les acides gras typiques trouvés, par exemple, dans des extraits de phosphatidylcholine du cerveau ont les compositions massiques suivantes 30 % pour (16: 0), 17 % pour (18: 0) et 33 % pour (18: 1) (notation : (longueur de la chaîne du carbone: insaturation), les données proviennent de http://avantilipids.com). En fonction du résidu fonctionnel et du pH, la tête polaire est zwitterionique ou chargée négativement et elle varie en taille. Les têtes polaires communément trouvées dans la membrane plasmique des cellules mammifères incluent la phosphatidylcholine (PC) (environ 50 %), la phosphatidyléthanolamine (PE) (environ 30 %), l'acide phosphatidique (PA) (< 2 %), le phosphatidylglycérol (PG) (< 2 %), la phosphatidylsérine (PS) (environ 10 %), le phosphatidylinositol (PI) (environ 5 %) (van Meer et al. 2008). La température de fusion par exemple de lipides avec des chaines à 18 Carbones sont de 6 °C pour le SOPC (18:0 -18:1) et -17 °C PC pour le DOPC (18:1- 18:1).

Sphingolipides Les sphingolipides sont des lipides complexes, issus de la molécule de sphingosine et présents principalement dans les membranes plasmiques. Ils comportent en outre une chaîne d'acide gras et une tête polaire. Cette tête peut être une PC comme dans le cas de la sphingomyéline (SM) (voir Figure 3) ou un sucre pour les glycosphingolipides. Les sphingolipides seuls sont généralement à l'état solide, mais sont fluidifiés par des stérols

comme le cholestérol avec lequel ils interagissent aussi de manière préférentielle (van Meer and de Kroon 2011).

Cholestérol Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par François Poulletier de la Salle. Toutefois, ce n'est qu'en 1814 que le chimiste français Eugène Chevreul lui donna le nom de *cholestérine (d'après https://fr.wikipedia.org)*. Le cholestérol possède une très petite tête polaire, un groupe hydroxyle -OH. Les stérols contiennent des cycles carbonés (4 pour le cholestérol) fournissant une structure rigide et plate comparée aux lipides, comme indiqué pour le cholestérol sur la Figure 3. Grâce à cette structure, ils imposent un ordre aux chaînes d'acides gras adjacentes et modifient la bicouche en la rendant plus épaisse, moins perméable à l'eau, plus durable et plus résistante à la lyse (Pan et al. 2008) (Pan et al. 2009) (Rawicz et al. 2008). Avec les sphingolipides et certaines protéines membranaires, le cholestérol contribue à la formation des plates-formes de signalisation de taille nanométrique (radeaux ou « rafts » en anglais) qui favorisent le regroupement de protéines et contribuent à leur fonction (Lingwood and Simons 2010) (Cf. la section II.2.1.5).

II.2.1.2.2 Les Bicouches lipidiques

Comme je l'ai déjà introduit précédemment, les molécules de lipides, compte tenu de leurs caractères amphiphiles s'orientent de façon à présenter leurs têtes hydrophiles vers les molécules d'eau. Ce faisant les chaînes carbonées apolaires des lipides s'auto-assemblent spontanément de façon à minimiser leurs contacts avec les molécules polaires de l'eau et par conséquent leurs énergies globales. Les auto-assemblages de ces molécules peuvent prendre de nombreuses formes, dépendant de la géométrie des molécules amphiphiles (Figure 4): les molécules "cylindriques" (avec une surface de tête similaire à la surface de la queue) préfèrent s'arranger dans des bicouches planes, tandis que les molécules en forme de cônes forment des structures courbées (Lipowsky and Sackmann 1995). On peut ainsi obtenir une large variété d'assemblages : micelle et micelle inverse, bicouche, vésicule, phase lamellaire (empilement de bicouches), phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), phase éponge ou phase cubique inverse bi-continue par exemple. Néanmoins, la plupart des lipides ont 2 chaînes hydrophobes et une concentration micellaire critique (cmc) très faible (de l'ordre du nM pour des lipides avec 2 chaînes de 16 Carbones) par rapport à des détergents (quelques mM pour le SDS par exemple). Dans ces conditions, même à très faibles concentrations en lipides, ils s'assemblent spontanément en des organisations supramoléculaires (Figure 4). Un type particulier de morphologie nous intéresse dans de cette thèse, car c'est la morphologie la plus courante : la bicouche lipidique constituée de deux monocouches. Notre intérêt s'est porté plus précisément sur le cas où la bicouche se referme sur elle-même pour former des objets appelés vésicules ou liposomes (voir Figure 4 c).

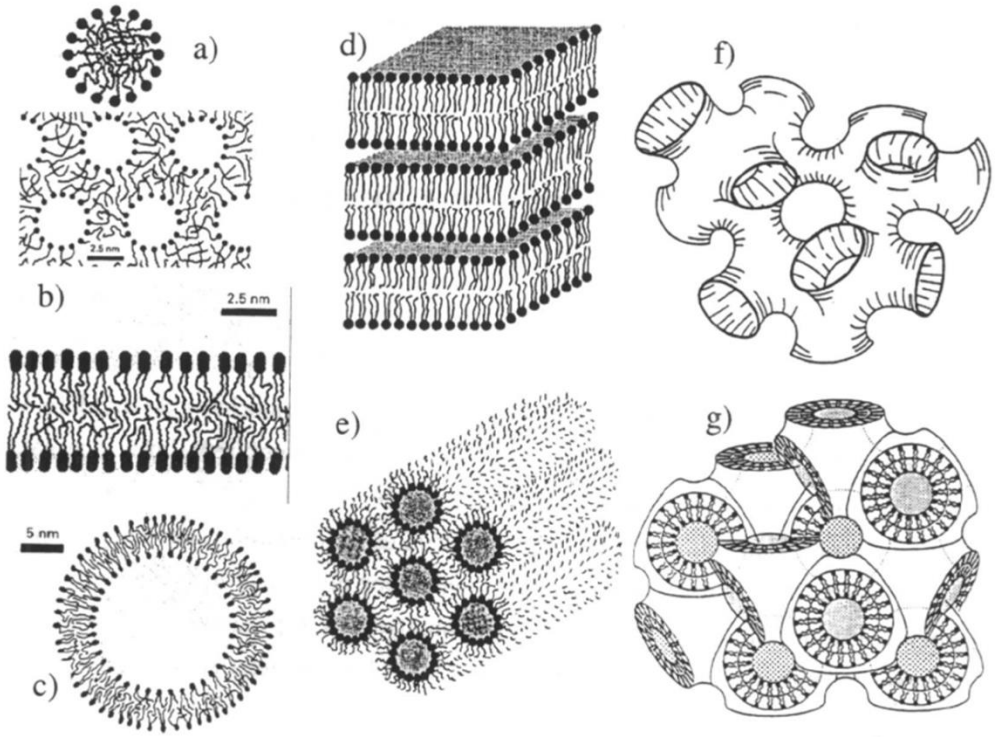


Figure 4 : Morphologies obtenues par auto-assemblage de molécules amphiphiles (conventionnellement les points représentent la partie hydrophile et les queues la partie hydrophobe. (a) Micelle et micelle inverse, (b) bicouche, (c) Vésicule, (d) Phase lamellaire (empilement de bicouches), (e) Phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), (f) phase éponge, (g) phase cubique inverse bicontinue. D'après (Israelachvili 1992) et (Lipowsky and Sackmann 1995).

Il existe des vésicules de diamètres allant de 20 nm à 100 µm. Il faut noter que l'épaisseur typique d'une bicouche lipidique est de l'ordre de 5 nm (Alberts et al. 2002, p. 584) (Andersen et al. 2007). Les vésicules peuvent être soit unilamellaires c'est-à-dire formées d'une seule bicouche de lipides ou soit multilamellaires c'est-à-dire formées de plusieurs bicouches de lipides. Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux vésicules unilamellaires. Les vésicules unilamellaires sont classées en trois catégories selon leur taille : les petites (Small Unilamellar Vesicles - SUV) de 20 à 50 nm de diamètre, les grandes (Large Unilamellar Vesicles - LUV) de 50 à 500 nm et les géantes (Giant Unilamellar Vesicles - GUV) de 0.5 à 100 µm. Ces liposomes sont obtenus par hydratation d'un film de lipides qui conduit à la formation spontanée de structures multilamellaires en oignons de diamètre de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, qui diffusent donc la lumière. A cause de leur forte courbure, la formation de SUVs nécessite une forte énergie mécanique et elles sont généralement obtenues par sonication de la préparation lipidique. Les LUVs quant à elles sont obtenues après une série de cycles d'extrusion à travers des membranes de porosité contrôlée.

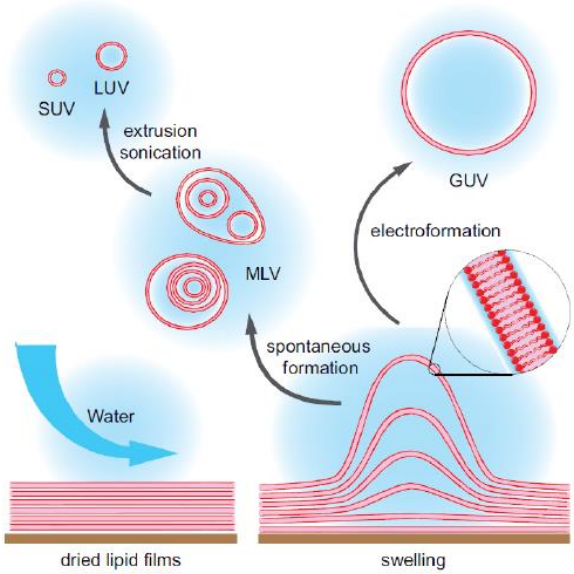


Figure 5 : Différents mécanismes permettant de former des SUVs, LUVs ou GUVs. D'après (Sun 2010)

Enfin, il existe différentes méthodes de préparation des GUVs : électroformation soit sur des plaques ou sur des fils conducteurs (Miglena I. Angelova and Dimitrov 1986) (M. I. Angelova et al. 1992) (Mathivet et al. 1996), soit par gonflement spontané sur des gels (agarose, PVA) (Weinberger et al. 2013) (Garten et al. 2015). Les protocoles de formation des SUVs et GUVs que j'ai utilisés dans ma thèse seront présentés au chapitre IV. Compte tenu de leur taille, les GUVs sont les seules à pouvoir être observées en microscopie optique et feront l'objet de notre étude. Il faut noter que nous travaillons ici avec des GUVs où la bicouche lipidique est dans la phase liquide. En d'autre terme les lipides utilisés dans notre étude ont des températures largement au-dessus de leur température de fusion (T_M).

II.2.1.3 **Les protéines membranaires**

Bien que les lipides soient des composants essentiels des membranes plasmiques, les protéines membranaires en constituent une fraction importante. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques notamment la signalisation, la bioénergétique, l'adhésion, la reconnaissance et le transport de solutés (Figure 6).

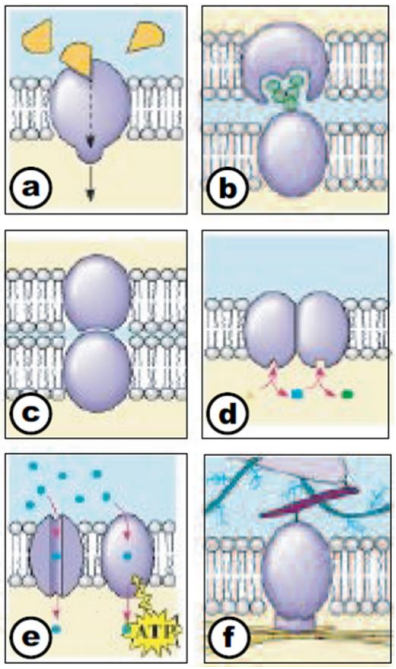


Figure 6 : Différents types de protéines membranaires et leurs fonctions : (a) Les récepteurs protéiques fixent spécifiquement des messagers chimiques (hormones, neurotransmetteurs) et génèrent une cascade de signaux qui modifient le comportement de la cellule. (b) Les chaînes oligo-saccharidiques des glycoprotéines jouent un rôle important dans les processus de reconnaissance cellulaire. (c) Les protéines d'adhérence intercellulaire (par ex. les cadhérines) attachent mécaniquement les cellules à leurs voisines. (d) Les protéines enzymatiques lient un substrat sur leur site actif et catalysent sa conversion en un produit final qui inhibe souvent les enzymes qui l'ont initié. (e) Les protéines de transport (canaux ou pompes) permettent à des solutés de traverser la membrane. (f) D'autres protéines d'adhésion (intégrines) permettent aux cellules de s'accrocher à la matrice extracellulaire. (Cette image a été prise dans la thèse de (Girard 2004))

Suivant leur structure, les protéines membranaires interagissent de différentes façons avec les membranes, comme illustré sur la Figure 7.

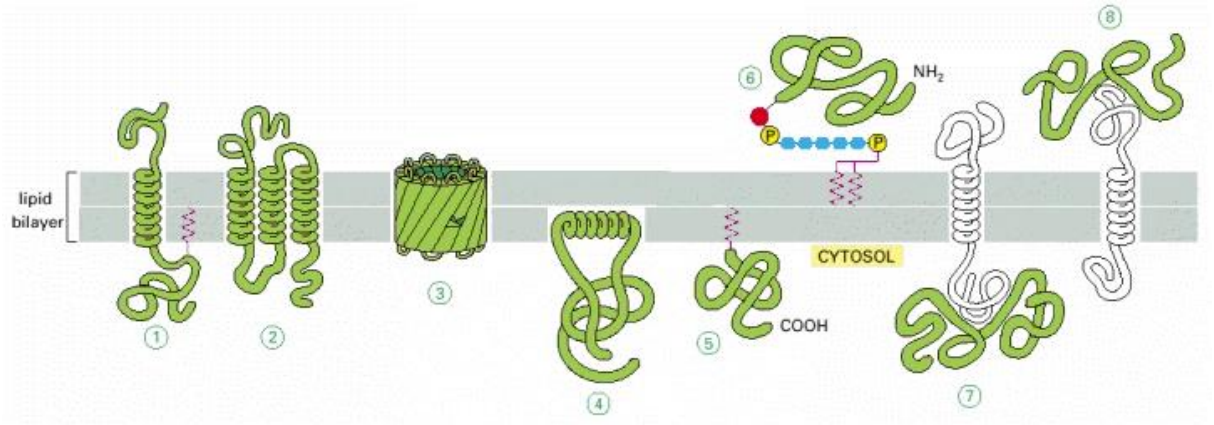


Figure 7 : Différents types d'ancrage d'une protéine membranaire avec la bicouche lipidique. (1,2) Ancrage transmembranaire par une hélice (1) ou plusieurs (2) hélices alpha hydrophobes. (3) Ancrage transmembranaire par un tonneau β. (4) Protéines ancrées à la surface par une hélice alpha amphipathique ou (5,6) par un ancrage lipidique. (7,8) Protéines attachées à la bicouche seulement par des interactions non covalentes avec d'autre protéines membranaires (Alberts et al. 2002, p. 594)

a) Certaines de ces protéines appelées « protéines transmembranaires » traversent la membrane de part en part (Figure 7-1,2,3). En effet, elles sont insérées plus ou moins profondément dans la membrane pour que leurs parties hydrophobes se trouvent entourées par les parties hydrocarbonées des lipides. Elles sont généralement amphiphiles : Elles sont

constituées de segments hydrophiles cytosoliques ou extracellulaires et d'une partie hydrophobe composée par exemple soit d'une seule hélice alpha (Figure 7-1), elles sont alors appelées « protéines transmembranaires à passage unique », soit de plusieurs hélices alpha (Figure 7-2). Certaines de ces protéines au lieu de s'arranger en hélice alpha forment des tonneaux bêta (β-barrel) de forme cylindrique (Figure 7-3). On retrouve ces protéines dans la membrane externe des mitochondries, des chloroplastes et des bactéries. Le nombre de brins β varie de 8 à 22 (Figure 8). Elles sont plus rigides et se cristallisent beaucoup plus facilement comparé aux protéines composées d'hélices alpha uniquement. La cristallographie par rayons X a été utilisée pour déterminer leur structure. Certaines de ces protéines forment des canaux aqueux qui permettent la diffusion de petits solutés hydrophiles à travers la bicouche lipidique de la membrane externe de la bactérie (Alberts et al. 2002, p. 594). La protéine de porine est un des exemples typiques: elle est composée de 16 brins β antiparallèles et transporte des petites molécules hydrophiles de part et d'autre de la membrane (Figure 8-3). C'est grâce à cette protéine que les composés polaires traversent la membrane. La protéine FepA est composée de 22 brins β et transporte les ions de fer à travers la membrane externe des bactéries. Cependant, certains tonneaux β composés de petits brins β ne forment pas des canaux. C'est le cas par exemple des protéines OmpA (Figure 8-1) et OMPLA(Figure 8-2) de *E. coli* composées respectivement de 8 et de 12 brins β jouant respectivement les rôles de récepteur et d'enzyme.

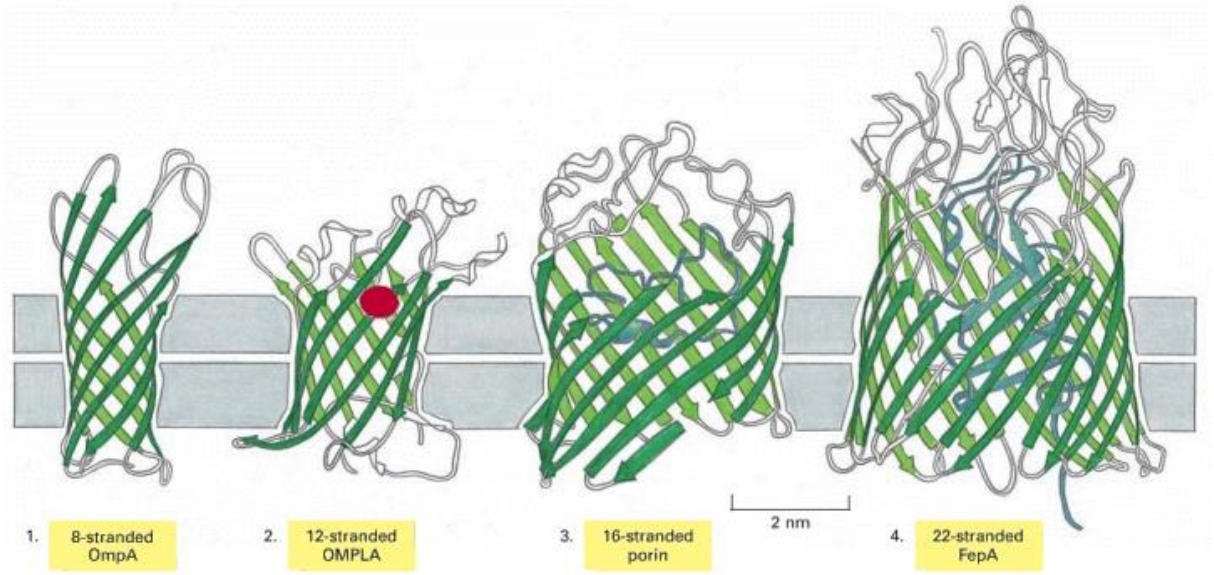


Figure 8 : Tonneaux β formés à partir de différents brins β. (1) Protéine OmpA de *E. coli* (8 brins β) jouant le rôle de récepteur pour un virus bactérien. (2) Protéine OMPLA de *E. coli* (12 brins β) est une enzyme qui hydrolyse les lipides. L'acide aminé qui catalyse la réaction enzymatique est montrée par le point rouge. (3) Protéine de porine qui forme un canal aqueux dans la membrane (16 brins β). Le diamètre du canal est réduit par la boucle représentée en bleue. (4) Protéine FepA de *E. coli* (22 brins β) qui transporte les ions de fer (Alberts et al. 2002, p. 594).

b) Certaines protéines ont également une nature amphiphile mais ne sont pas transmembranaires. Ces protéines ont plus d'affinité pour la surface cytosolique de la bicouche lipidique. En effet, elles sont attachées par exemple à la monocouche cytosolique par une hélice alpha amphipathique dont les résidus hydrophobes s'insèrent dans la monocouche en laissant les résidus hydrophiles à la surface (Figure 7-4). Elles peuvent aussi posséder une chaine lipidique liée de façon covalente qui permet de les ancrer à la membrane par une chaîne d'acide gras, par exemple un groupe prénylé (Figure 7-5). Une catégorie importante concerne les protéines à ancre GPI qui sont liées à la membrane sur le feuillet non-cytosolique par l'intermédiaire d'un lipide, le *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) (Alberts et al. 2002, p. 594) (Figure 7-6). Globalement, les protéines de cette catégorie n'interagissent qu'avec un seul feuillet des bicouches des membranes.

c) D'autres protéines sont appelées « protéines périphériques ». Au lieu d'interagir avec la partie hydrophobe de la bicouche, elles ont plutôt une forte affinité pour la partie hydrophile des protéines transmembranaires (Figure 7-7,8). En effet, comme leur nom l'indique, ces protéines restent à la périphérie des membranes et n'interagissent pas directement avec la membrane. A titre d'exemple, on peut citer les phospholipases A ou C qui ont pour fonction d'hydrolyser respectivement les phospholipides ou les lipides phosphatidylinositol.

d) D'autres protéines transmembranaires avec des structures plus complexes appelées « transporteurs » changent de conformation entre deux états de telle sorte que le site de liaison du soluté soit séquentiellement accessible d'un côté de la bicouche à l'autre, permettant ainsi le transport de solutés à travers la membrane (Figure 9-A). Il y a aussi les canaux ioniques qui permettent le transport d'ions spécifiques à travers la membrane lors de leur ouverture en formant un canal aqueux (Figure 9 B). Dans les deux cas, le processus de transport est appelé transport passif c'est-à-dire qu'il se fait dans le sens du gradient de concentration (voir Figure 10).

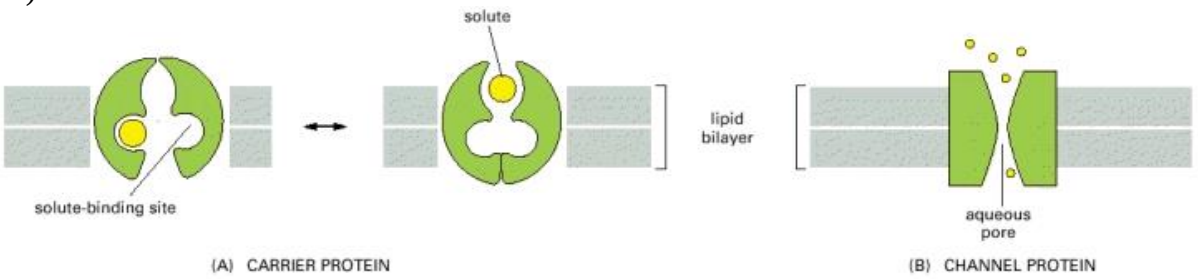


Figure 9 : (A) Transporteurs de solutés d'un côté de la membrane à l'autre. (B) Canal ionique. (Alberts et al. 2002, p. 594)

Ce processus est aussi appelé « diffusion simple ». Il ne nécessite pas d'apport d'énergie pour faire passer les solutés d'un côté à l'autre de la membrane. Le processus nécessite cependant de l'énergie pour permettre le changement de conformation des protéines. D'autre part, la cellule a besoin de transporteurs qui pompent des solutés de façon à rétablir des gradients. Ces transporteurs sont appelés "pompes" et utilisent en plus de l'énergie pour transporter activement des ions dans le sens inverse du gradient de concentration. Dans le transport actif, l'activité de pompage est directionnelle car elle est étroitement couplée à une source d'énergie métabolique, telle que l'hydrolyse de l'ATP ou le gradient ionique (Figure 10). Il est important de noter que les transporteurs peuvent être passifs ou actifs (pompes) tandis que les canaux ioniques sont toujours passifs.

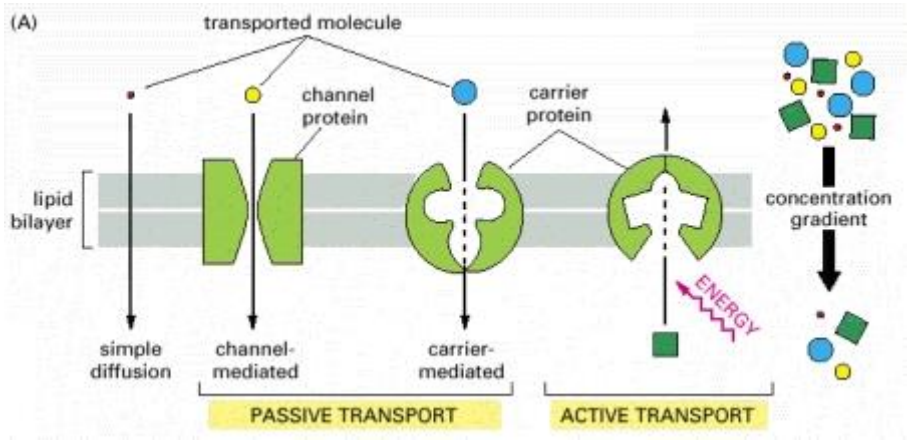


Figure 10 : Processus de transport passif (dans le sens de gradient de concentration) et actif (contre le gradient de concentration) (Alberts et al. 2002, p. 594)

e) On trouve également des protéines avec des structures plus complexes encore impliquant plusieurs sous-unités, comme le centre réactionnel photosynthétique qui utilise l'énergie lumineuse pour pomper des protons à travers la membrane des bactéries.

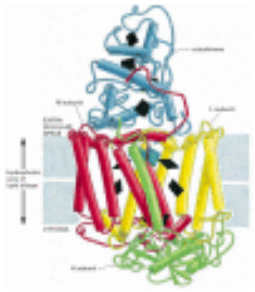


Figure 11: Structure schématique du centre réactionnel photosynthétique de la bactérie *Rhodopseudomonas viridis* (Alberts et al. 2002, p. 594)

Les membranes cellulaires contiennent une **très grande concentration de protéines**. La fraction relative de lipides par rapport aux protéines ou aux glycoprotéines dans les membranes varient suivant les types cellulaires et suivant les organelles (Alberts et al. 2002) (Figure 12). On peut constater sur la Figure 12 que les membranes contiennent une très large proportion de protéines allant de 50% à 70% selon le type de membrane. Seules les cellules de la myéline qui constitue la couche qui entoure certains axones contiennent environ 80% de lipides. De plus, les séquençages complets des génomes de différents organismes indiquent qu'environ 25% des gènes codent pour des protéines membranaires (Jones 1998) (Almén et al. 2009).

Membranes	Protein	Lipid	Carbohydrate
Plasma membranes:			
red blood cells	49	43	8
liver cells	54	36	10
amoeba	54	42	4
myelin	18	79	3
Nuclear envelope	66	32	2
Endoplasmic reticulum	62	27	10
Golgi complex	64	26	10
Mitochondrion			
outer membrane	55	45	trace
inner membrane	78	22	---
Chloroplast inner membrane	70	30	---

Figure 12 : Fractions massiques relatives en protéines, lipides et glucides de diverses membranes (Alberts et al. 2002)

On voit par exemple sur la Figure 13-B que la membrane des globules rouges est très encombrée de protéines. Sur ce cliché de microscopie électronique en "freeze fracture", (Stryer 1997), les protéines membranaires apparaissent comme des points blancs. La partie au centre de l'image correspond au feuillet cytosolique et on réalise facilement que la fraction de surface est très élevée, et supérieure à celle visible sur le feuillet externe (gros points blancs hors de la partie centrale de la Figure 13-B). Il a aussi été possible de reconstituer la composition protéique des vésicules synaptiques (Figure 13-A). Ces vésicules d'un diamètre moyen d'environ 40 nm sont impliquées dans la transmission de neurotransmetteurs entre neurones. En 2006, le groupe de R. Jahn a réussi le tour de force d'identifier et de compter les protéines membranaires présentes dans ces vésicules. Ils ont ainsi réussi à reconstituer un modèle moléculaire de vésicule synaptique où on peut voir que les protéines occupent la plus

grande fraction de la surface de la vésicule. Ils ont évalué que 1/4 du volume de la membrane était occupé par des domaines transmembranaires et qu'il y avait 130 000 régions transmembranaires par μm^2 de membrane (Takamori et al. 2006).

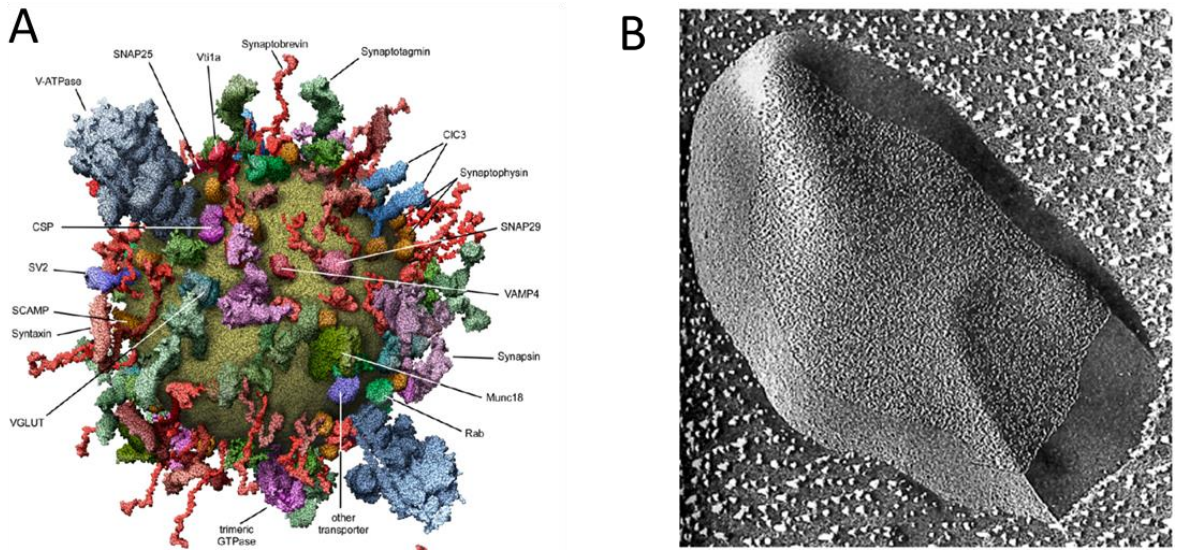


Figure 13 : Les vésicules synaptiques (A) sont très largement constituées de protéines (Takamori et al. 2006). La membrane des globules rouges (B) est composée par de nombreuses protéines (petit point blanc) à l'intérieur de la membrane (Stryer 1997).

Même si ces 2 exemples sont relativement extrêmes, il faut retenir que dans la plupart des membranes, on ne peut pas considérer que les protéines sont diluées dans une matrice lipidique et il faut donc considérer ces **effets d'encombrement** ("**crowding**" en anglais).

En 1972, pour essayer de comprendre comment les protéines sont organisées dans les membranes, Singer et Nicolson avaient proposé un premier modèle de membrane dans lequel la membrane est considérée comme un fluide à 2D dans lequel peu de protéine isolées diffusent librement (Figure 14-A) (Singer and Nicolson 1972) (Cf. § II.2.1.4 pour plus de détails). Dans ce modèle appelé « mosaïque fluide », les protéines très diluées n'influencent pas l'organisation de la membrane.

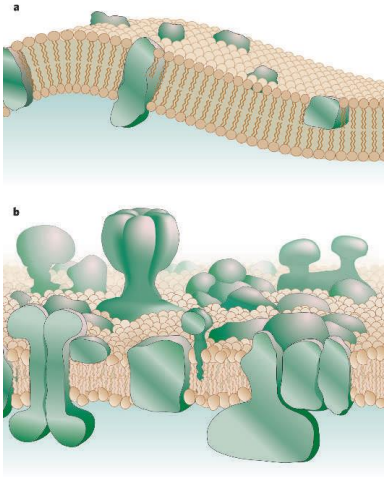


Figure 14 : Modèles généraux de membrane. A-Modèle initial de Singer et Nicolson : Peu de protéines (en vert) dans la membrane (Singer and Nicolson 1972). B- Modèle de Singer et Nicolson revisité pour tenir compte de l'encombrement des protéines dans la membrane (Engelman 2005).

Au cours des années, une nouvelle vision prenant en compte la participation des protéines membranaires à l'organisation de grands complexes fonctionnels a commencé à émerger (Wong and Scott 2004). Comme nous allons le détailler plus loin, il a fallu prendre en compte les différents types d'organisation dans les membranes résultant des interactions lipides-lipides et lipides-protéines et également le fait que les lipides peuvent former des complexes spécifiques avec des protéines (Grigorieff et al. 1996). De plus, de nombreuses études avaient montré que les protéines n'étaient pas diluées, mais plutôt concentrées dans la plupart des membranes. Donc, un modèle plus élaboré d'organisation membranaire avait ainsi pu être proposé (Figure 14-B ; (Engelman 2005)).

II.2.1.4 **Propriétés physico-chimiques de la bicouche**

Structure membranaire en mosaïque fluide : Fluidité de la bicouche

Une des questions importantes sur les membranes est de déterminer comment les lipides et les protéines membranaires sont organisés dans la bicouche lipidique. La réponse n'est pas triviale. En s'appuyant sur les données expérimentales accumulées sur la morphologie, la biochimie et la physiologie des membranes cellulaires en 1972, Singer et Nicolson proposèrent alors un modèle moléculaire dit « en mosaïque fluide » (Figure 14-A) décrivant la membrane comme un fluide bidimensionnel isotrope, correspondant à la phase fluide Lα au-dessus de la température de fusion des chaînes lipidiques Tc (Lipowsky and Sackmann 1995). Comme je l'ai indiqué auparavant dans le § II.2.1.2.1, T_c dépend de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras. Tous les phénomènes de la physiologie cellulaire impliquent que les membranes sont fluides, donc que la distribution des longueurs et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras soit adaptée dans les membranes biologiques pour maintenir la membrane fluide aux températures physiologiques.

Le modèle de Singer et Nicolson prend en compte la dynamique des membranes et leur fluidité. Au-dessus de leur température de transition Tc, les lipides bougent librement dans la bicouche suivant le mouvement brownien. La membrane a alors la propriété d'un fluide à deux dimensions (Figure 15). De même, les protéines membranaires peuvent elles aussi se déplacer mais plus lentement que les lipides. Des mesures quantitatives du coefficient de diffusion latérale des lipides et des protéines ont été effectuées grâce aux techniques de FRAP (Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ou en anglais Fluorescence Recovery After Photobleaching), RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et RPE (Résonance Paramagnétique Electronique). Les valeurs ainsi obtenues sont de l'ordre de $D \cong 10^{-7} - 10^{-8}$ $cm^2.s^{-1}$ pour les molécules lipidiques (Baeriswyl et al. 1986) et de $D \cong 10^{-10}$ $cm^2.s^{-1}$ pour les protéines transmembranaires dans les membrane biologiques. Il faut noter que les coefficients de diffusion des protéines membranaires reconstituées dans une bicouche lipidique sont environ 2 ordres de grandeur plus élevés (Przybylo et al. 2006). Je reviendrai sur l'origine de cette différence plus loin. Les molécules de lipide peuvent aussi tourner sur elles-mêmes autour de l'axe z (perpendiculaire à la membrane) avec un coefficient de diffusion rotationnel de $D_r = 10^{-8}\ s^{-1}$ (Lipowsky and Sackmann 1995) . Enfin, il existe la possibilité pour les lipides de passer d'un feuillet à l'autre de la bicouche. C'est ce qu'on désigne par le terme anglais « *flip-flop* ». Néanmoins c'est un phénomène qui reste lent car il est énergétiquement très défavorable de faire passer la tête polaire des lipides à l'intérieur de la partie hydrophobe constituée par les queues apolaires des lipides. Le temps caractéristique de ce phénomène de bascule est de l'ordre de $D_f = 10^{-8}\ s^{-1}$ (Alberts et al. 2002).

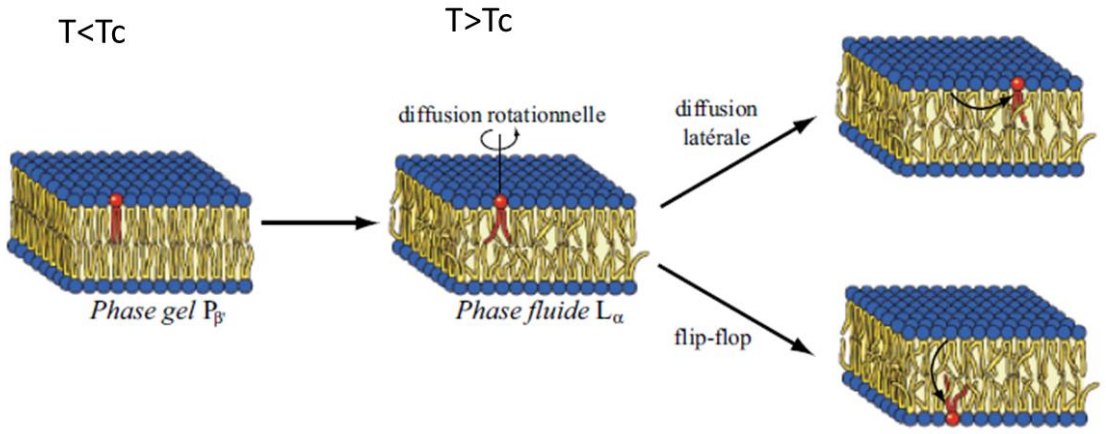


Figure 15 : Au-dessus de la température de fusion des chaînes acyles (Tc), une membrane lipidique passe d'une phase gel $P_{\beta'}$ (ou cristalline rigide) où les chaînes d'acides gras ont de fortes interactions hydrophobes, à une phase fluide moins ordonnée Lα où les chaînes d'acides gras sont plus mobiles. Cette phase fluide est caractérisée par des comportements dynamiques au sein de la bicouche, qui sont à l'échelle microscopique les diffusions latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou flip-flop) avec des échelles de temps caractéristiques totalement différentes (Figure de (Lipowsky and Sackmann 1995)).

II.2.1.5 **Inhomogénéités latérales et "radeaux lipidiques" dans les membranes :**

- *Mise en évidence dans les systèmes biologiques*

Depuis les années 90, la vision de l'organisation des membranes cellulaires ou artificielles a évolué. En effet, la bicouche lipidique qui constitue ces membranes n'est plus vue comme un fluide homogène. En effet, il y a au sein de la membrane des inhomogénéités lipidiques, appelés radeaux ou "rafts" en anglais. Ce modèle de « raft » a été proposé en 1988 par K. Simons et G. Van Meer pour expliquer l'asymétrie de transport membranaire dans les cellules polarisées (Simons and Van Meer 1988). Ces auteurs ont étudié la distribution de sphingolipides nouvellement synthétisés dans les cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) et ont montré qu'un glycosphingolipide simple, le glucosylcéramide, est transporté préférentiellement au domaine apical de la cellule. Pour expliquer ce tri préférentiel, il a été proposé l'existence d'agrégats ("clusters") de glycosphingolipides dans le feuillet exocytoplasmique de la membrane du Golgi (Simons and Van Meer 1988). Le modèle a été renforcé un an après suite à l'observation que les membranes des cellules épithéliales sont polarisées en domaines apical et basolatéral (Rodriguez-Boulan and Nelson 1989). Le premier domaine est enrichi en sphingolipides (glycosphingolipides et sphingomyéline) alors que le second contient essentiellement des glycérolipides et la phosphatidylcholine. Le mélange des sphingolipides (apical) et de phosphatidylcholine (basolatéral) qui sont tous les deux localisés sur le feuillet exoplasmique de la membrane plasmique, est empêché par les jonctions serrées entre les deux domaines à la surface cellulaire qui bloquent la diffusion (van Meer 1989) (Simons and Van Meer 1988). Les sphingolipides étant synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, cette distribution différentielle suggérait l'existence de domaines lipidiques à la surface des membranes de cette organelle qui permettaient la formation de vésicules de transport de compositions différentes. K. Simons et G. van Meer avaient proposé que ces radeaux étaient des micro-domaines lipidiques riches en cholestérol, glycolipides, sphingolipides et en phospholipides présentant moins d'insaturation que les lipides dans la membrane environnante. Par ailleurs, la mise en évidence de l'existence de microdomaines lipidiques dans la membrane plasmique, riches en glycolipides, sphingolipides et cholestérol, insolubles et résistants aux détergents non ioniques notamment au Triton X-100 à 4 °C

(Deborah A. Brown and Rose 1992) avait constitué la première preuve de l'existence de microdomaines dans les membranes cellulaires, en particulier dans la membrane plasmique. Pendant une période, la confusion a régné car les radeaux étaient tout d'abord assimilés aux domaines lipidiques résistants aux détergents.

- *Domaines lipidiques et séparation de phase dans les systèmes synthétiques*

Initialement, la principale preuve de l'existence de radeaux était basée sur des études biophysiques des membranes artificielles qui avaient montré, dans certaines conditions, la coexistence de domaines lipidiques d'organisations différentes. En effet comme je l'ai introduit dans le paragraphe II.2.1.2.1 les lipides peuvent passer de la phase solide ordonnée « S_0 » à la phase liquide désordonnée « L_d » dans la membrane au-dessus de leur température de transition. De plus, en présence de cholestérol, l'existence d'une phase liquide ordonnée « L_0 » avait été mise en évidence, permettant une transition de la phase solide S_0 à la phase L_o pour les lipides saturés (D. A. Brown and London 1998) (Sankaram and Thompson 1990) (Almeida et al. 1992), ou de L_d vers L_o pour les lipides insaturés (Simons and Vaz 2004). La coexistence des phases L_d et L_o est possible au-dessus de la température de transition des lipides (Figure 16) (D. A. Brown and London 1998).

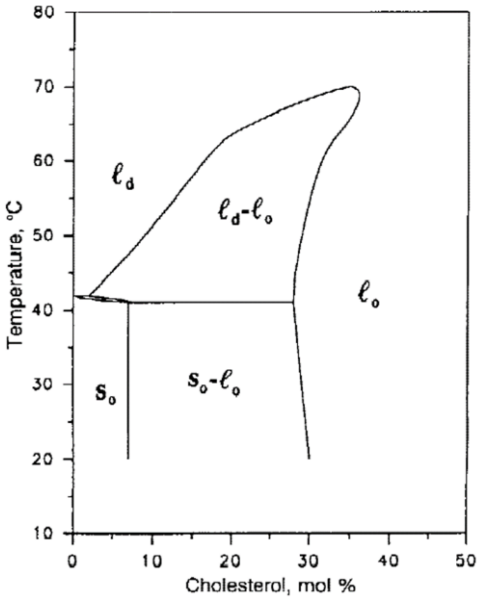


Figure 16 : Diagramme de composition de phase du système DPPC-Cholestérol en fonction de la température. $S_0 = s_0$ (solide), $L_{d\,=}\, l_d$ (liquid désordonné), $L_{o\,=}\, l_o$ (liquid ordonné) (D. A. Brown and London 1998)

Plus tard, grâce à l'avènement de la microscopie confocale et de la microscopie à 2 photons, des études sur des vésicules géantes (GUVs) de mélanges ternaires (Bagatolli and Gratton 1999), par exemple DOPC-Sphingolyéline-cholestérol, ont montré qu'il est possible d'obtenir une séparation de phases pour certaines compositions lipidiques, entre la phase liquide ordonné L_o riche en SM (marquée en bleue) et une seconde phase liquide désordonné L_d riche en DOPC (marquée en rouge). Un exemple typique observé en 2003 par Baumgart et al., en microscopie à deux photons illustre bien cette coexistence de phase (Figure 17) (Baumgart et al. 2003). Ces expériences in vitro démontraient donc que des mélanges lipidiques comprenant des lipides saturés et insaturés et du cholestérol, composants principaux de la membrane plasmique, pouvaient conduire à la présence de domaines lipidiques de taille micrométrique, du moins à l'équilibre thermodynamique.

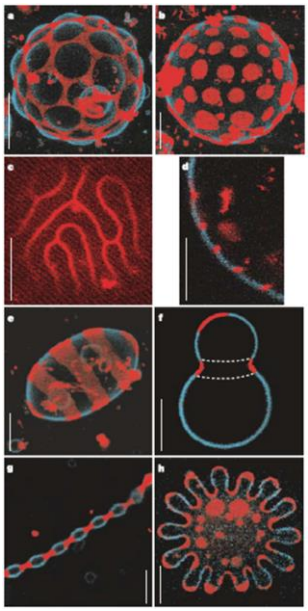


Figure 17 : Visualisation de la séparation de phase pour de vésicules géantes de composition ternaire DOPC-Cholestérol-SM. La phase liquide ordonné (L_o) est marquée en bleu, la phase liquide désordonnée (L_d) est marquée en rouge (Baumgart et al. 2003).

Ces deux phases L_o et L_d sont fluides mais la diffusion des lipides dans ces phases est différente. Cela a été montré par Kahya avec la méthode de FCS (voir § II.2.4.1.2). Les résultats qu'ils ont obtenus sont résumés sur la Figure 18. Ils ont montré que le coefficient de diffusion était bien plus grand dans la phase liquide désordonné L_d par rapport à celui de la phase liquide ordonné L_o (Kahya et al. 2003).

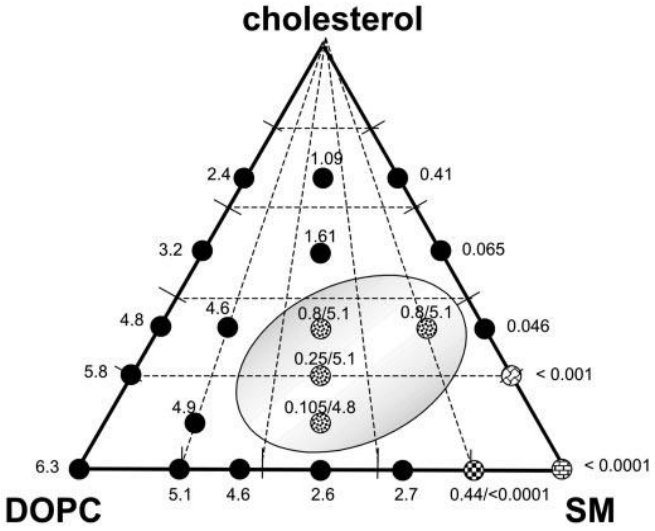


Figure 18 : Diagramme de phase ternaire DOPC-Cholestérol-SM construit à partir des mesures de leur coefficient de diffusion par FCS. Les points noirs correspondent à des compositions homogènes fluides, les points en briques à des phases gel pures, et les autres à des coexistences de phases. Les nombres au-dessus de chaque point correspondent au coefficient de diffusion en $\mu m^2.s^{-1}$ (Kahya et al. 2003).

- *Domaines lipidiques dans des membranes issues de membrane plasmique*

Il est possible d'obtenir des vésicules géantes à partir de la membrane plasmique de cellules. Elles sont formées soit par un procédé chimique conduisant au "blebbing" des cellules et appelées GPMV (Giant Plasma Membrane Vesicles) (Baumgart et al. 2007), soit par gonflement lent des cellules et appelées PMS (Plasma Membrane Spheres) (Lingwood et al.

2008). Ces vésicules géantes conservent donc la composition lipidique et protéines de la membrane plasmique mais ne possèdent plus de cortex d'actine et de processus "actifs" (elles sont considérées à l'équilibre). Dans les 2 cas, il a été montré qu'une séparation de phase de type L_o/L_d avait lieu dans la membrane lorsqu'on refroidissait des vésicules de membrane plasmique, similaire à celle observée avec un mélanges ternaire DOPC-Sphingomyéline (BSM)-cholestérol dans des GUVs (Figure 19) (Sezgin et al. 2012). Bien que les deux phases L_o et L_d présentent des niveaux d'ordre différents dans les membranes naturelles et synthétiques, ces expériences ont permis de montrer que les membranes naturelles sont proches d'une séparation de phase et que la présence du cytosquelette empêchent la formation de domaines macroscopiques (Sezgin et al. 2012).

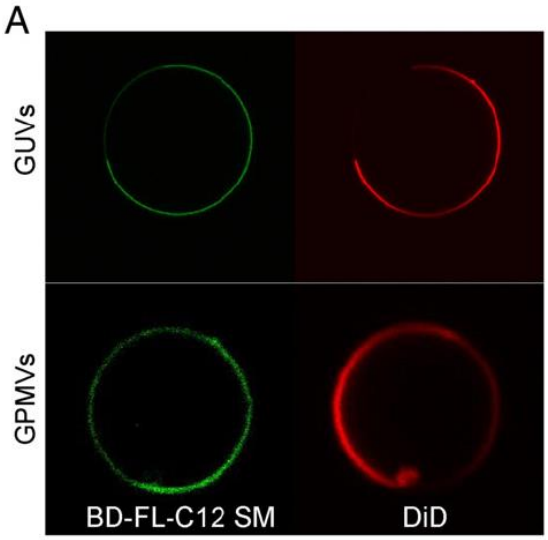


Figure 19 : Image confocale des GUVs et GPMVs formées à partir de cellules RBL-2H3C (imagées à 10°C), marquées par des analogues lipidiques fluorescents, BD-FL-C12 SM (en vert) et DiD (en rouge, connu comme marqueur de phase désordonnée L_d).

- *Modèle actuel des rafts*

Les avancées en microscopie et en spectroscopie (par exemple SPT, FCS, FRET (Förster Energy Transfert), STED (Stimulated-Emission Depletion), PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)) ont pu mettre en évidence que les « rafts » sont des assemblages ordonnés nanométriques, très dynamiques, très fluctuants, riches en sphingolipides et cholestérol, auxquels peuvent s'associer des protéines à ancre GPI, des protéines transmembranaires ou des effecteurs cytosoliques acylés. Tous ses constituants ainsi que l'actine peuvent moduler la taille des rafts (Hancock 2006) (Lingwood and Simons 2010) (Simons and Gerl 2010) (Figure 20-A). Les protéines transmembranaires ne participent pas toutes à la formation de rafts (par exemple celles représentées en gris sur la Figure 20-A). D'autre part, ces assemblages dynamiques métastables peuvent être activés par des interactions spécifiques lipide-lipide, protéine-lipide et protéine-protéine (par exemple la liaison de ligands multivalents, l'oligomérisation de protéines) et coalescer pour former des plateformes de signalisation et de trafic intracellulaire de taille plus importante (Figure 20-B). A ce stade, les filaments d'actine peuvent renforcer ces assemblages. Finalement, dans une situation d'équilibre thermodynamique, des domaines macroscopiques sont observés dans les GPMVs et les PMSs (les phases "rafts), assez semblables à la phase Lo des GUVs synthétiques (Figure 20-C).

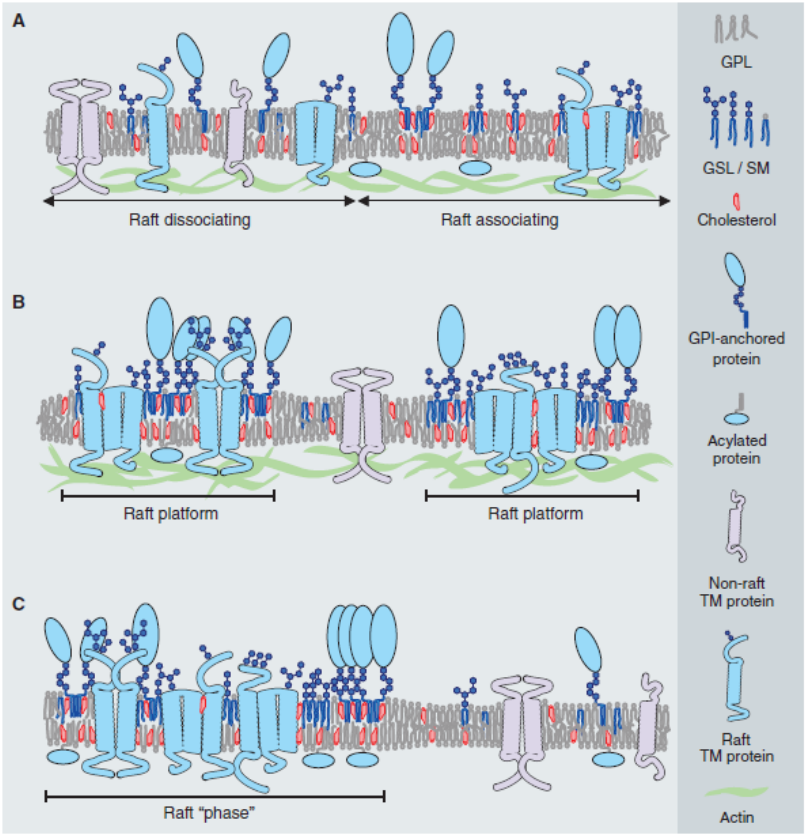


Figure 20 : Hiérarchie de l'hétérogénéité des radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires. (A) Domaines nanométriques de stérols et de sphingolipides. Les protéines à ancre GPI, des protéines trans-membranaires, des effecteurs cytosoliques acylés et l'actine corticale peuvent participer et moduler ces assemblages. (B) La liaison de ligands, la multimérisation de protéines induisent la coalescence des nanodomaines, formant ainsi des plateformes pour la signalisation et le trafic intracellulaire. (C) Formation de macro-domaines dans un système à l'équilibre (GPMV, PMS), (Lingwood and Simons 2010).

A plus grande échelle, l'organisation latérale de la membrane plasmique est très hétérogène. On peut avoir différents types de radeaux dans la membrane plasmique. Comme on peut voir sur la Figure 21, il y a des régions contenant des radeaux lipidiques très distincts et des régions où il n'y a pas du tout de radeaux lipidiques (Sezgin et al. 2017).

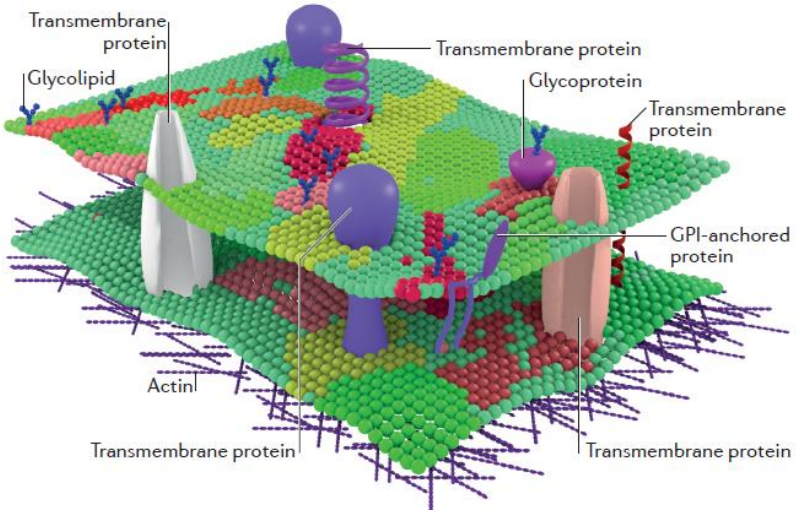


Figure 21 : Hétérogénéité latérale de la membrane plasmique : La membrane est constituée de domaines de radeaux lipidiques distincts et de zones dépourvues de domaines (Sezgin et al. 2017).

II.2.1.6 **Modèle de « corrals » ou domaines délimités par le cytosquelette**

Les mesures de mobilité de protéines et de lipides dans les membranes plasmiques ont fortement contribué à établir de nouveaux modèles de l'organisation membranaire. Contrairement à ce que propose le modèle de mosaïque fluide (Singer and Nicolson 1972), les protéines ne sont pas toujours libres de diffuser dans des membranes cellulaires. En effet, la diffusion des protéines et des lipides est beaucoup plus lente (100 fois plus petite) dans la membrane cellulaire que dans les membranes modèles (Kusumi et al. 2012). Le groupe d'A. Kusumi avait déjà proposé en 1993 puis en 2002 un modèle dans lequel les protéines membranaires sont confinées soit dans des petits domaines membranaires de 300 à 600 nm, soit par les filaments d'actine du cytosquelette sous-membranaire, soit par des protéines liées au cytosquelette d'une part et ancrées à la membrane plasmique d'autre part (Figure 22) (Kusumi et al. 1993) (Fujiwara et al. 2002).

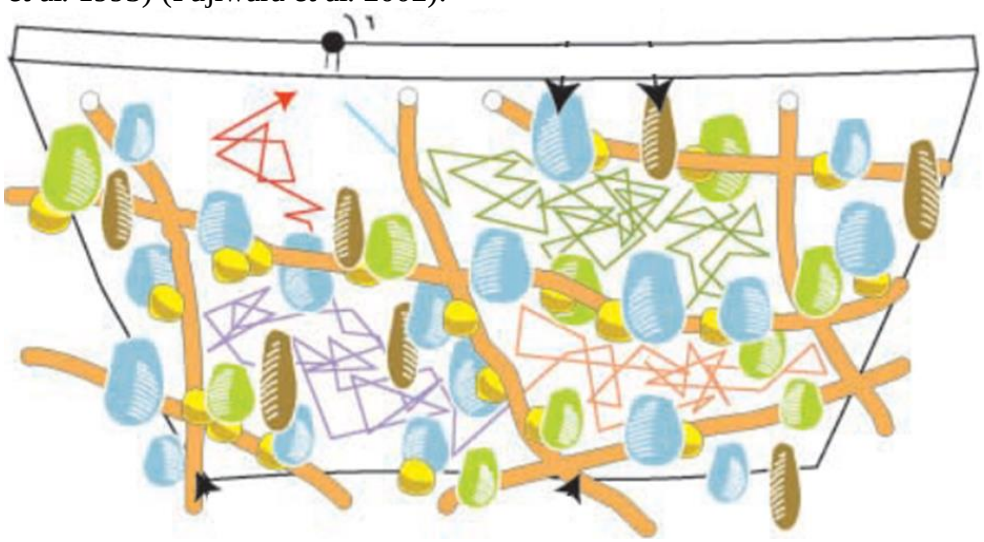


Figure 22 : Modèle de « barrières et piquets » de la face interne de la membrane. Le cytosquelette (orange) constitue des mailles de quelques centaines de nm qui bloquent partiellement les protéines membranaires (bleu, marron, vert). D'après (Fujiwara et al. 2002)

Dans le même sens, il a été montré que le maillage du cortex subdivise la membrane plasmique en petits compartiments. En effet, pour deux types de cellules, fibroblastes et kératinocytes, le maillage a été caractérisé quantitativement par tomographie en microscopie électronique, et les résultats ont donné des tailles de maille moyennes différentes suivant le type cellulaire: 50 nm pour les kératinocytes (FRSK) et 200 nm pour les fibroblastes (NRK) (Morone et al. 2006). En parallèle, des expériences de suivi de particules uniques ont été réalisées sur les membranes des cellules vivantes mettant en évidence deux types de temps caractéristiques très différents : a) une diffusion relativement rapide aux temps courts, sur des distances de l'ordre de la taille de maille du cortex, b) une diffusion considérablement réduite aux temps longs. A partir de ces observations, la théorie de la diffusion par saut (« hop diffusion ») a été proposée (Sako and Kusumi 1994) (Fujiwara et al. 2002) (Kusumi et al. 2005) (Morone et al. 2006) (Umemura et al. 2008). Dans ce modèle théorique, la diffusion est libre à l'intérieur des domaines délimités par le cytosquelette d'actine mais est fortement restreinte par les filaments d'actine qui sont très proches de la membrane et qui forment donc une sorte de "corral" (Figure 23-A et B).

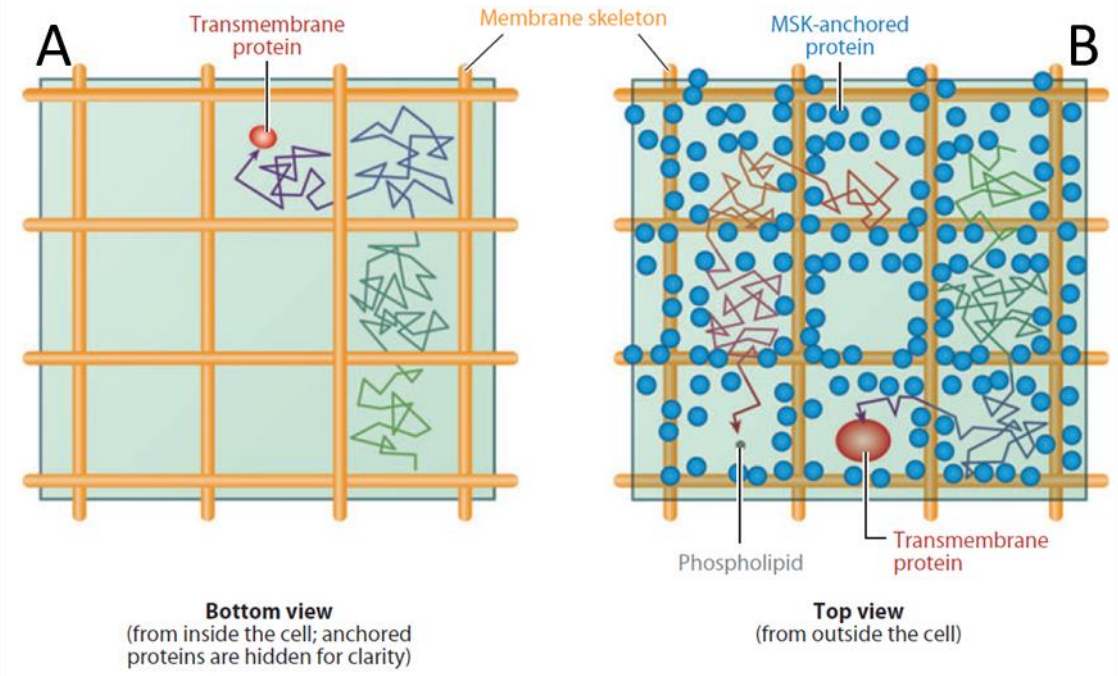


Figure 23 : Une autre représentation du modèle de « barrières et piquets » (A) Barrières de squelette membranaire (Membrane skeleton (MSK) en anglais) (jaune). (B) Protéines ancrées au cytosquelette sous forme de "piquet" affectant la diffusion des protéines (Kusumi et al. 2012).

Néanmoins, les sauts entre les petits domaines membranaires, la « hop diffusion », sont favorisés par les fluctuations thermiques ce qui engendre une diffusion lente aux temps longs. Ce modèle explique de façon assez claire l'origine de la restriction de la diffusion observée pour les protéines et les lipides dans la membrane cellulaire.
Par ailleurs, l'effet de la taille du maillage du réseau de filaments d'actine sur la diffusion des lipides et des protéines a été étudié en détails in vitro et in vivo. En effet, récemment il a été montré en utilisant la méthode de FCS sur un système reconstitué de cortex d'actine sur des GUVs que les coefficients de diffusion des protéines (ici la toxine de choléra attachée à la membrane) étaient plus réduits que ceux des lipides par la présence du cortex et qu'ils diminuaient lorsque la densité d'actine augmentait à la surface de la membrane (Heinemann et al. 2013). Une autre étude in vivo a suggéré que la taille de la maille d'actine influence fortement la mobilité des protéines (Iino et al. 2001). De plus, les mêmes auteurs ont constaté que les oligomères d'une protéine membranaire (ici, la E-cadhérine) diffusaient beaucoup plus lentement que ce qui serait attendu du fait de l'augmentation de taille lors de l'oligomérisation (Saffman 1976), ce qu'ils avaient attribué à un effet de confinement accru par le réseau d'actine sur les oligomères par rapport aux monomères. En effet, les oligomères ont une probabilité de saut très réduite par rapport aux monomères.

II.2.1.7 **Modèle « d'agrégats dynamiques »**

Ce modèle développé par N. Destainville et ses collaborateurs, s'oppose au modèle de « corrals » et propose une source de confinement des protéines autre que le cytosquelette, qui prend en compte, sous forme d'agrégats dynamiques, les interactions attractives entre protéines à suffisamment longue portée (Destainville 2008). En effet, différentes interactions entre protéines membranaires, médiées par la membrane elle-même, ont été proposées (Mark Goulian 1996) (Dommersnes and Fournier 1999) (Phillips et al. 2009) (Yolcu and Deserno 2012) (Weitz and Destainville 2013). Contrairement au modèle de radeaux lipidiques où les domaines se forment tout d'abord à partir de la séparation de micro-phases lipidiques qui

ensuite recrutent des protéines spécifiques, le modèle d'agrégats dynamiques propose que la formation de domaines soit gouvernée par les interactions entre protéines. Pour tester le modèle de « corrals » ou de « saut entre compartiment », ils avaient développé un algorithme de détection de saut dans les trajectoires de récepteurs GPCR (le récepteur μ aux opioïdes) obtenues par SPT (Daumas et al. 2003). Les résultats obtenus ont montré que les trajectoires comportaient en fait très peu de sauts et donc, ne permettaient pas de confirmer le modèle de barrière rigide. D'autre part, ils ont montré que la mobilité des récepteurs était affectée par la taille de la zone de confinement à des temps bien plus courts que le temps nécessaire à explorer cette zone par diffusion, dans un modèle de corral. Sur la base de leurs observations, ils avaient proposé le modèle d'agrégats dynamiques que je détaillerai plus loin dans la partie V.3.4 car il m'a servi pour analyser mes expériences. Ce modèle prévoit que les protéines diffusent à l'intérieur de domaines protéiques, dont le centre de masse diffuse également dans la membrane.
De nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'agrégats protéiques dans les membranes cellulaires soit à partir de la mesure de la mobilité des protéines, par FRET et/ou anisotropie de fluorescence (Goswami et al. 2008) et plus récemment grâce à l'avènement des méthodes de microscopie haute-résolution (Lang and Rizzoli 2010) (Betzig 2015). Cependant, l'origine de ces clusters de protéines et les interactions impliquées sont probablement diverses et encore très discutées.

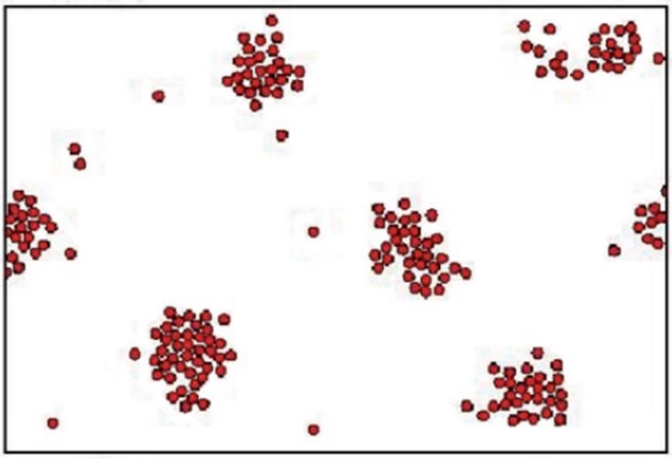


Figure 24 : Simulation d'un modèle de « particules browniennes en interaction». Les interactions attractives entre protéines membranaires (en rouge) conduisent à l'existence d'assemblées de protéines causant leur confinement (Salomé et al. 2006)

II.2.1.7.1 Perméabilité

La bicouche lipidique constitue une barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Elle possède une perméabilité sélective aux petites molécules hydrophobes comme l'O_2, le CO_2 ou l'N_2 ou hydrophiles comme l'eau ou le Glycérol. Ces dernières pénètrent facilement à l'intérieur de la partie hydrophobe de la membrane et sont capables de la traverser rapidement par diffusion simple lorsque leur concentration est différente entre les milieux intra et extra-cellulaire, ce qui crée une différence de pression osmotique. Cette diffusion passive peut donc se faire en l'absence de protéines spécialisées comme les transporteurs, les canaux ou les pompes. Par contre, les molécules chargées, ions et métabolites, traversent beaucoup plus difficilement cette bicouche lipidique (Balaz 2009). La bicouche lipidique est totalement imperméable aux longues molécules, et quasiment imperméable aux ions tels que Na^+ et K^+.
Les molécules diffusent à des vitesses différentes en fonction de leur capacité à pénétrer dans l'intérieur hydrophobe de la bicouche. Ainsi pour les bicouches de phosphatidylcholine, les perméabilités (qui ont la dimension d'une vitesse) sont très faibles $\Lambda_P = 10^{-14}$ m.s^{-1} pour l'ion

Na^+ et Λ_P = 3x 10^{-14} $m.s^{-1}$ pour le K^+ (Stryer 1997) (Michael Jansen. 1994). Mais les membranes sont bien plus perméables aux molécules polaires solubles de faible poids moléculaire telles que l'éthanol et plus encore l'eau avec Λ = 25x 10^{-6} $m.s^{-1}$ pour une membrane de DOPC (Olbrich et al. 2000). La perméabilité augmente rapidement avec le nombre d'insaturations (Olbrich et al. 2000). Les coefficients de perméabilité de différentes molécules à travers la bicouche lipidique sont présentés sur la Figure 25.

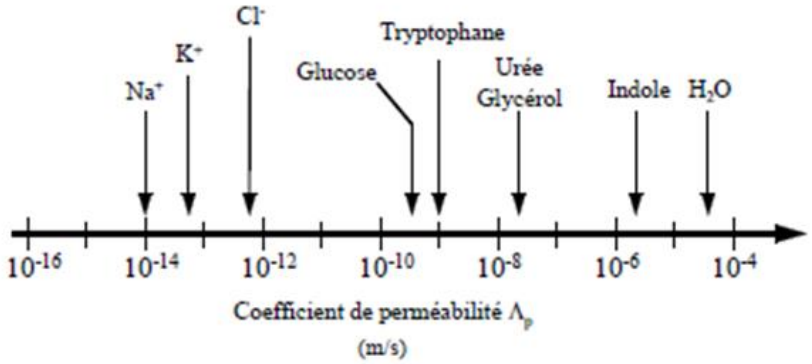


Figure 25 : Coefficients de perméabilité de différentes molécules à travers la bicouche lipidique en phase fluide d'après (Stryer 1997)

II.2.1.7.2 Elasticité membranaire

La membrane lipidique est un objet dynamique capable de se déformer pour établir certaines fonctions membranaires : les processus de fusion et fission membranaires nécessitent par exemple une courbure de la membrane. Les travaux théoriques d'Helfrich et Canham permettent de décrire l'énergie nécessaire pour déformer des membranes lipidiques (Canham 1970) (Helfrich 1973). Dans cette théorie la membrane a été considérée comme un matériau homogène et isotrope et a été modélisée comme une surface élastique. En appliquant une contrainte extérieure sur cette surface élastique, on peut envisager trois modes de déformation de la membrane : un mode d'extension /compression induisant un changement d'aire, un mode de cisaillement induisant une extension latérale à une aire constante et un mode de courbure comme illustrés sur la Figure 26. Un module élastique est associé à chacun de ces modes. Les modules élastiques des différents matériaux et des lipides sont donnés au Tableau 1.

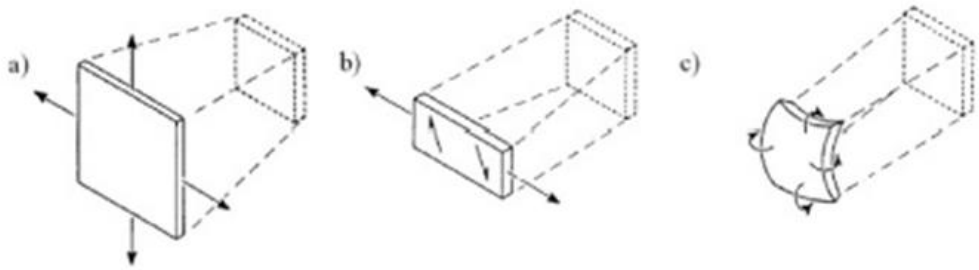


Figure 26 : Les trois modes de déformation possibles des membranes: a) mode de compression-extension induisant un changement d'aire, b) mode de cisaillement induisant une extension latérale à une aire constante, et c) mode de courbure (E. Evans and Rawicz 1990).

Extension/compression Le premier mode de déformation élastique est caractérisé par un module de compression χ (en $J.m^{-2}$) et s'effectue dans le plan de la membrane (Figure 26 a). L'énergie associée par unité de surface, H_{ext}, nécessaire pour augmenter l'aire d'une partie de

la membrane de A à A+ΔA dépend de façon quadratique de la variation de surface et s'écrit de la façon suivante :

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

où χ (en J.m^{-2}) est le module de compressibilité caractérisant la cohésion des lipides dans la bicouche. χ a été mesuré à l'aide de micropipette pour des vésicules de différentes compositions et vaut par exemple 0.23 J.m^{-2} pour une bicouche de DOPC (Rawicz et al. 2000). Ce module change relativement peu avec le nombre d'insaturations sur les chaînes carbonées.

Cisaillement Le deuxième mode de déformation est le cisaillement qui s'effectue lui aussi dans le plan de la membrane mais à aire constante (Figure 26 b). Il est caractérisé par un module de cisaillement μ. L'énergie associée par unité de surface, H_{shear}, est obtenue à partir de la loi de Hooke et s'écrit :

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

où $\lambda = (L_0 + \Delta L)\, L_0$ est le taux d'extension latérale de la membrane. Pour des membranes fluides, les lipides peuvent diffuser librement sans aucune contrainte de cisaillement et donc cette contribution mécanique est négligeable. Cependant, ce mode de déformation devient important dans le cas où la membrane est associée au cytosquelette.

Courbure Le troisième mode de déformation combine toutes les déformations qui ne sont pas dans le plan de la membrane (Figure 26 c). C'est le mode de déplacement dominant. On définit la courbure de deux façons : la courbure moyenne $(c_1 + c_2)$ et la courbure gaussienne $(c_1 c_2)$ avec $c_i = 1/R_i$ où R_i (i=1,2) sont les 2 rayons de courbures principaux de la membrane. En fonction de la forme de la déformation, le signe de la courbure gaussienne est positif ou négatif. L'énergie de courbure associée par unité de surface, $H_{courbure}$, s'écrit :

$$H_{courbure} = \frac{1}{2}\kappa\,(c_1 + c_2\ + c_0)^2 + \kappa_G\, c_1 c_2 \qquad (3)$$

où c_0 est la courbure spontanée de la membrane c'est-à-dire la courbure propre de la membrane au repos et sans aucune contrainte mécanique appliquée (elle est égale à zéro lorsque la membrane est plane), κ est le module de rigidité de courbure et κ_G le module de rigidité gaussienne.
L'énergie associée à la courbure intégrée sur l'ensemble de la membrane, est donnée par le Hamiltonien ($\mathbf{H_c}$) (dit de Canham-Helfrich) suivant :

$$\mathbf{H_c} = \oint \mathrm{H_{courbure}}\,\mathrm{dA} = \oint \left(\frac{1}{2}\kappa(\mathrm{c_1} + \mathrm{c_2} + \mathrm{c_0})^2\right)\mathrm{dA} \qquad (4)$$

Il faut noter que le terme relatif à la courbure gaussienne est omis en général, tant que la membrane garde la même topologie, car il est constant en raison du théorème de Gauss-Bonnet.

Material	Compression Modulus χ (J/m^2)	Shear Modulus μ (J/m^2)	Curvature Modulus κ (J)
Steel	100	100	10^{-15}
Poly-Ethylene	5	5	5×10^{-17}
Red blood cell	10^{-5}	6×10^{-6}	$2\text{-}70\times10^{-20}$
Lipid bilayer	$100\text{-}700\times10^{-3}$	0	$4\text{-}40\times10^{-20}$

Tableau 1 : Valeurs des trois modules élastiques χ, μ et κ pour différents matériaux d'après (Sackmann 1994).

II.2.1.7.3 Tension latérale de la membrane

Le dernier paramètre macroscopique intensif important pour décrire les propriétés physico-chimiques d'une membrane lipidique est sa tension latérale σ (en N.m^{-1}) qui est donnée par :

$$\sigma = \frac{\partial F}{\partial A} \quad (5)$$

Où *F* est l'énergie libre totale de la membrane et A sa surface. On peut définir deux régimes différents pour la tension membranaire en fonction de l'extension, un régime d'élasticité entropique à faible extension et un régime d'élasticité enthalpique pour les fortes extensions. Si le mode de cisaillement est négligé, la densité d'énergie élastique associée à une variation d'aire ΔA pour une membrane peut être écrite comme suit :

$$H = H_{ext} + H_{courbure} = \frac{1}{2}\chi\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \frac{1}{2}\kappa\,(c_1 + c_2 + c_0)^2 + \kappa_G\, c_1 c_2 \quad (6)$$

L'énergie totale de la membrane est HA.

Dans le régime enthalpique, un étirement de la membrane augmente l'aire moyenne par lipide, et ainsi la contribution terme élastique, H_{ext} est également augmentée. La tension latérale d'origine enthalpique est donc de la forme :

$$\sigma = \frac{\delta(HA)}{\delta(\Delta A)} \quad (7)$$

La tension obtenue pour une membrane tendue est de la forme :

$$\sigma = \chi\frac{\Delta A}{A} \quad (8)$$

Cette expression s'applique uniquement aux vésicules tendues (Figure 27-b) quand l'aire réelle (observée en microscopie) et l'aire projetée de la vésicule sont égales (Figure 27-c).

Expérimentalement, les vésicules sont souvent peu tendues et leur contour n'est pas lisse à l'échelle optique; les fluctuations sont importantes et l'entropie du système est élevée (Figure 27-a). Dans ces conditions, l'aire réelle observée de la vésicule en microscopie (A) est plus grande que l'aire projetée (Ap) de la vésicule (Figure 27-c). On peut par exemple utiliser une micropipette pour augmenter l'aire projetée de la membrane en réduisant les fluctuations (Cf. § IV.2.3.1). Ce faisant, on diminue l'entropie de la membrane et donc on augmente l'énergie libre de la membrane. Si l'aire réelle de la vésicule ne varie pas et que la surface de vésicule reste fluide, la tension totale d'origine entropique le long de la membrane reste homogène et la densité d'énergie par unité de surface est de la forme :

$$H = \frac{1}{2}\kappa\,(c_1 + c_2 + c_0)^2 + \sigma\frac{\Delta A}{A} \quad (9)$$

Le théorème de l'équipartition d'énergie permet enfin de calculer la tension totale le long de la membrane. Cette tension est de la forme :

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{8\pi\kappa}{k_B T}\left(\frac{A - A_p}{A}\right)\right) \quad (10)$$

Où σ_0 est la tension de la membrane reliée à une coupure microscopique « cut-off » associée à la taille des lipides (Fournier et al. 2001), k_B est la constante de Boltzmann et T la température. Plus la différence entre la surface projetée et la surface réelle est élevée plus la vésicule fluctue et plus la tension de la membrane est basse.

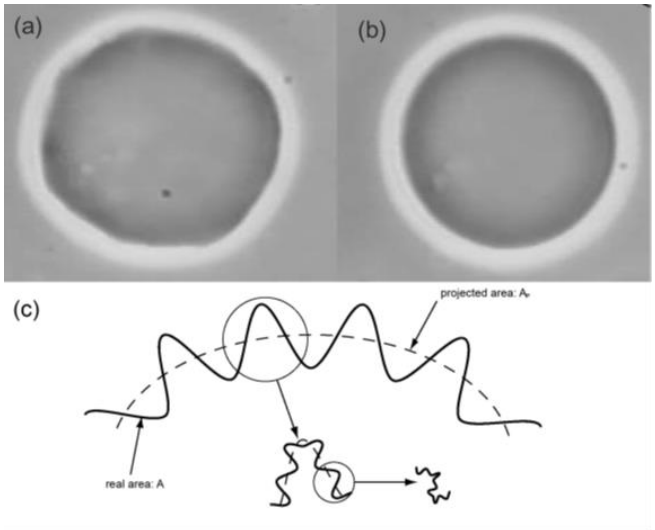


Figure 27 : Image d'une GUV obtenue en microscope optique (a) Vésicule peu tendue : les fluctuations de membranes sont optiquement visibles. (b) Vésicule tendue : pas de fluctuation détectable optiquement (c) Représentation schématique d'une membrane "froissée". A représente l'aire réelle de la vésicule et A_P représente l'aire projetée de la vésicule. Cette image a été prise dans la thèse de (Streicher 2008, p. p 38)

Pratiquement, les tensions membranaires mesurées pour les membranes lipidiques varient entre 10^{-8} N.m^{-1} et 10^{-2} N.m^{-1}. Les membranes lipidiques sont très fragiles et se rompent au-delà d'une tension appelée tension de lyse. Celle-ci dépend fortement de la composition lipidique. Elle a été mesurée pour une large gamme de compositions à partir de mesures de micropipette et est de l'ordre de quelques mN.m^{-1} à 10 mN.m^{-1} (Olbrich et al. 2000).

Dans mes expériences, je m'intéresse à l'effet de la concentration des protéines uniquement sur la dynamique des lipides et des protéines. J'ai donc travaillé à forte tension (10^{-4} N.m^{-1}) pour limiter les effets liés aux déformations membranaires en limitant bien évidemment les fluctuations des GUVs grâce à une aspiration micropipette.

II.2.2 Introduction au mouvement Brownien

Cette partie a été en grande partie inspirée d'une revue de Duplantier que nous vous invitons à regarder pour avoir plus de détails (Duplantier 2005).

En 1827, en observant des grains de pollen au microscope le botaniste Robert Brown constata la présence de très petites particules, éjectées par des grains de pollen dans l'eau, bougeant

dans tous les sens. Celles-ci avaient un mouvement aléatoire apparemment sans fin (R. Brown 1828) (Figure 28). Quelque chose probablement dans l'eau, une force ou un moteur inhérent aux particules elles-mêmes les poussaient infiniment. Brown observa le même phénomène avec d'autres types de particules : certaines organiques, d'autre inorganique (comme des particules de poussière, de suie et de roche pulvérisée). Etant donné que les particules inorganiques suivaient le même phénomène, il en a conclu que le phénomène observé n'avait pas une origine biologique. En ce qui concerne la nature du mouvement brownien, il ne put l'expliquer mais il avait écarté des explications simples comme celles liées au courant de convection et d'évaporation en montrant que le mouvement brownien d'une simple particule restait tout aussi « infatigable » dans une goutte d'eau isolée que dans de l'huile (Duplantier 2005). Dans le même sens, il avait écarté l'idée de mouvement crée par des chocs incessants entre des particules browniennes. Toutefois cette dernière idée sera reprise plus tard.

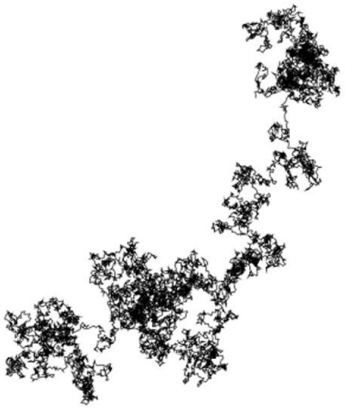


Figure 28 : Mouvement du centre de gravité d'une particule de pollen en suspension révélant le mouvement brownien (Duplantier 2005)

II.2.2.1 **Explication du mouvement Brownien avant Einstein**

Avant qu'Albert Einstein ne propose en 1905 une théorie spectaculaire pour expliquer la cause du mouvement brownien, vers 1860 plusieurs groupes montrèrent que le mouvement brownien augmente quand la taille de la particule diminue (et qu'on ne l'observe plus pour des particules de rayon supérieur à 1 µm), quand la viscosité diminue et quand la température augmente. Ces auteurs conclurent que la cause du mouvement brownien était à rechercher au sein du fluide lui-même et que les mouvements aléatoires observés étaient dûs aux chocs permanents entre les particules.
En 1863, Christian Wiener en conclusion de ses expériences en laboratoire, réaffirma que la cause du mouvement brownien ne pouvait être dû ni aux chocs permanents entre les particules ni à la différence de température ni à l'évaporation et aux courants de convection. Sa théorie des mouvements atomiques mêlait des agitations des molécules et des atomes d'éther. Selon sa théorie l'agitation des atomes d'éther à la longueur d'onde du rouge et la taille du plus petit groupe de molécule se déplaçant ensemble seraient la cause du mouvement brownien (Wiener 1863). Une hypothèse que Bache rejette dans l'article qu'il publia en 1894 dans lequel il montra que le mouvement brownien était insensible à la lumière rouge ou violette (Bache 1894). Néanmoins les travaux de Jean Perrin en 1909 corroboraient l'hypothèse de Winer qui stipulait que les agitations moléculaires pouvaient donner l'explication du mouvement brownien (Perrin 1909).
Entre 1877 et 1880, Giovanni Cantonni de Pavie et deux Jésuites, Joseph Delsaulx et Ignace Carbonelle proposèrent les mouvements moléculaires calorifiques du fluide ambiant comme la cause du mouvement brownien (Duplantier 2005).

Toutefois, ce point de vue ne reçut pas d'approbation de la part de Karl Von Nageli un cytologiste d'origine Suisse et spécialiste de la théorie cinétique des gaz et de William Ramsey un chimiste britannique. Ces derniers pensaient que les particules en suspension dans le fluide avaient une masse de centaines de millions de fois plus élevée que la masse des molécules du fluide dans lequel elles sont en agitation. Ces auteurs conclurent que les chocs permanents entre les molécules du fluide sont insuffisants pour faire déplacer la particule. Ils proposèrent alors que les forces répulsives et attractives sont la cause du mouvement brownien.

Il fallut attendre 1888 pour que les travaux de Louis-Georges Gouy, un physicien français, sur l'agitation moléculaire apportent un regain d'intérêt aux travaux de Brown. Il tira les conclusions suivantes sur le mouvement brownien de ses travaux :

- il s'agit d'un mouvement extrêmement irrégulier, dont la trajectoire semble ne pas avoir de tangente ;
- deux particules browniennes, même proches, ont des mouvements indépendants l'un de l'autre ;
- plus les particules sont petites, plus leur mouvement est vif, bien que la nature et la densité des particules n'aient toutefois aucune influence ;
- le mouvement est plus actif dans les fluides les moins visqueux ;

ce mouvement est plus actif à haute température et il ne s'arrête jamais (Duplantier, 2005).

II.2.2.2 **Explication théorique par Albert Einstein**

En 1905 pour décrire une particule qui diffuse, Einstein se basa sur la mécanique statistique et fournit une interprétation théorique quantitative du mouvement Brownien. Il met en évidence deux lois qui caractérisent le mouvement brownien :

- le déplacement entre deux instants suit une loi gaussienne ;
- la particule n'a pas de mémoire. Quand elle arrive à un endroit, elle a oublié ce qu'elle a fait avant et donc ce qu'elle va faire par la suite n'est absolument pas influencé par ce qu'elle a fait avant (Janand 2013).

Dans un processus diffusif, on peut calculer le déplacement quadratique moyen en 3 D. En d'autre terme si la particule est à t=0 à la position $r_0(0,0,0)$, elle sera à un instant t à la position r telle que :

$$\langle r^2 \rangle = 6\,Dt \tag{11}$$

où D est le coefficient de diffusion de la particule. Einstein, en supposant que les particules en suspension sont des sphères de rayon a et en utilisant la formule de Stockes donnant le coefficient de friction μ ("drag coefficient" en anglais, inverse du coefficient de mobilité) d'une sphère plongée dans un fluide continu de viscosité η :

$$\mu = 6\pi\eta a \tag{12}$$

démontra que D est de la forme :

$$D = \frac{k_B\,T}{6\pi\eta a} \tag{13}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann et T la température absolue. Dans cette expression on voit bien que le coefficient de diffusion D augmente avec la température ou les fluctuations thermiques (k_BT), la taille des particules (de rayon inférieur au μm) ou diminue quand la viscosité augmente. Ces observations sont en accord avec les données expérimentales du dix-neuvième siècle (voir le paragraphe II.2.2.1). Quatre ans plus tard les prédictions d'Einstein ont été vérifiées expérimentalement par Jean Perrin (Perrin 1909).

Dans la suite je vais présenter la théorie de diffusion 2D des protéines dans des membranes.

II.2.3 Théorie de la diffusion des protéines dans des membranes : vers un modèle physique

II.2.3.1 **Le modèle de Saffman et M. Delbrück inspiré par Singer et Nicolson**

Comme je l'ai déjà mentionné auparavant, la modélisation de la membrane plasmique a fait l'objet de longs débats. Dans le modèle de "mosaïque fluide" de Singer et Nicolson (1972) la membrane est considérée comme une matrice lipidique fluide bidimensionnelle dans laquelle les protéines globulaires isolées sont distribuées de manière aléatoire et libres de diffuser. Dans ce modèle, la densité des protéines ou la fraction surfacique occupée par des protéines (Φ) est très faible (Figure 14-A et Figure 29). Il est alors possible d'appliquer l'analyse de mouvement brownien aux molécules diffusant dans la bicouche lipidique.

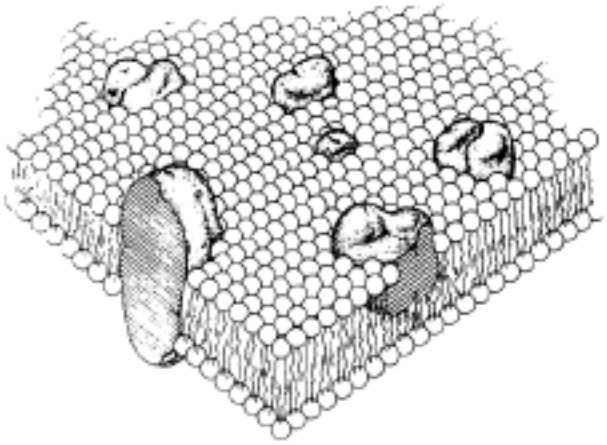


Figure 29 : Modèle de la mosaïque fluide : les protéines membranaires isolées diffusent librement dans la bicouche lipidique (d'après (Singer and Nicolson 1972))

C'est ce qui fut fait trois ans plus tard par P.G. Saffman et M. Delbrück (SD) en s'inspirant des modèles précédemment développés par Einstein et Smoluchowski en 1906 pour la diffusion à 3D (Saffman and Delbrück 1975). Ils ont ainsi proposé la première étude théorique du mouvement brownien pour des molécules libres diffusant dans une membrane telle que celle proposée par Singer et Nicolson. Dans leur modèle, la membrane est considérée comme un plan infini de fluide visqueux (lipide) de viscosité μ séparant des régions infinies d'un liquide moins visqueux (eau) de viscosité μ'. La protéine est considérée comme un cylindre, avec un axe perpendiculaire au plan de la membrane, se déplaçant latéralement dans le plan (x,y) de la membrane et pouvant aussi tourner autour de l'axe z, sous l'action du mouvement brownien (Figure 30) (Saffman and Delbrück 1975).

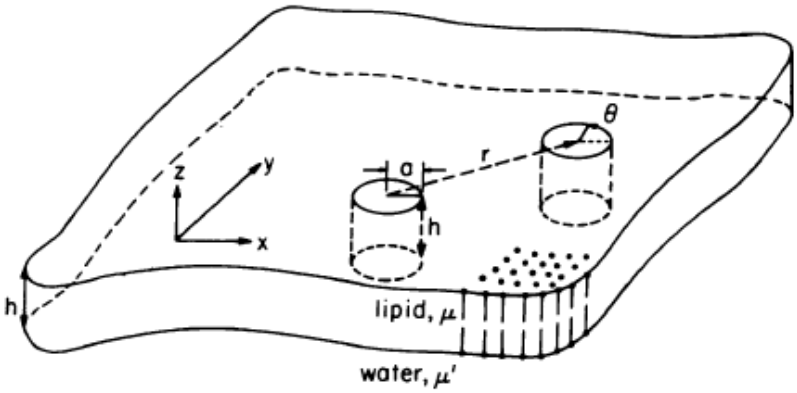


Figure 30: Modèle de Saffman and Delbruck (SD) pour la diffusion d'inclusions membranaires. Les protéines membranaires isolées de forme cylindrique diffusent librement dans la bicouche lipidique entourée d'une phase aqueuse de chaque côté. La protéine peut se déplacer latéralement dans le plan (x,y) et tourner autour de l'axe z (Saffman and Delbrück 1975).

La diffusion d'une particule due au mouvement brownien est décrite par les coefficients de diffusion, D_T et D_R, pour les déplacements de translation et de rotation. Pour le mouvement dans un plan et la rotation autour d'un axe perpendiculaire :

$$\overline{r^2} = 4D_T\,t \qquad\qquad \overline{\Theta^2} = 2D_R\,t \tag{14}$$

où $\overline{r^2}$ et $\overline{\Theta^2}$ sont le déplacement et la rotation angulaire au carré moyens en fonction du temps t; les coefficients de diffusion sont reliés à la mobilité des particules par les équations d'Einstein :

$$D_T = k_B\mathrm{T}b_T \qquad\qquad D_R = k_B\mathrm{T}b_R \tag{15}$$

Où k_B est la constante de Boltzman, T la température absolue et b la mobilité définie par la vitesse produite par unité de force.

En pratique, à cause du paradoxe de Stockes, il n'existe pas de solution exacte au problème de diffusion d'inclusions dans un fluide bidimensionnel. Néanmoins, Saffman and Delbruck ont proposé des solutions dans deux cas limites: a) Prise en compte de la viscosité du milieu environnant, b) la membrane a une taille finie.

a) Viscosité finie du milieu extérieur. Dans ce régime, on suppose que la membrane est parfaitement fluide (pas de cisaillement) et que les mouvements des 2 fluides sont transmis par les inclusions présentes dans la membrane. Dans ces conditions, il est possible de calculer les coefficients de diffusion D_T et D_R des protéines de forme cylindrique de rayon a dans la limite d'un grand contraste de viscosité entre la membrane et le fluide environnant. Ces coefficients sont de la forme :

$$D_T = \frac{k_B\mathrm{T}}{4\pi\mu_m}\left[\log\left(\frac{l}{a}\right) - \gamma\right] \tag{16}$$

et

$$D_R = \frac{k_B\mathrm{T}}{4\pi h\mu_m a^2} \tag{17}$$

où la longueur $l = \frac{\mu_m}{\mu'}$ est la longueur caractéristique de SD (Saffman-Delbruck), avec $\mu_m = \mu h$, h l'épaisseur de la bicouche, et γ est la constante d'Euler. Le paramètre sans dimension de SD $\varepsilon = \frac{l}{a}$ représente physiquement le rapport des résistances hydrodynamiques de la protéine dans la membrane fluide et du fluide extérieur à la membrane. Lorsque $\varepsilon \gg 1$, la résistance hydrodynamique due au mouvement dans la membrane domine et c'est le régime considéré par Saffman et Delbrück qui est pertinent pour les petites inclusions (pour les petites valeurs du rayon de l'inclusion « a », qui est la seule échelle de longueur latérale considérée dans le modèle). Lorsque $\varepsilon \ll 1$, la résistance se produit principalement en raison du mouvement dans le fluide externe et c'est le régime pertinent pour les grandes inclusions. Dans ce cas, comme le mouvement est principalement produit dans le fluide externe, il est décrit par la formule de Stokes-Einstein, avec une mobilité en 1/a. Le croisement « cross-over » entre les deux régimes est obtenu lorsque la taille de l'inclusion est de l'ordre de l~500 nm, pour un rapport typique des viscosités $\frac{\mu}{\mu'}$ = 100 et une épaisseur de membrane h = 5 nm (d'après (Démery and Lacoste 2018)).

b) Membrane de taille finie.
Si l'on considère que la membrane a une taille finie, et que sa taille est représentée par un disque de rayon R avec R>> a, le modèle SD propose que la diffusion est simplement donnée par :

$$D_T = \frac{k_B \mathrm{T}}{4\pi\mu_m}\left[\log\left(\frac{R}{a}\right)\right]$$

Le calcul de la diffusion latérale a essentiellement révélé que la diffusion rotationnelle D_R dépend uniquement de la viscosité de la membrane tandis que la diffusion latérale D_T est fonction de la taille de la protéine (a), de la viscosité de la membrane (μm) et de la viscosité du milieu environnent la membrane (μ'). Elle dépend aussi faiblement, « logarithmiquement », de la taille des protéines. Cette dépendance logarithmique avec la taille des protéines a été confirmée pour des expériences in vitro sur des membranes contenant des protéines transmembranaires (Ramadurai et al. 2009). Par contre, les expériences de Gambin et al ont montré une déviation importante du modèle de SD et proposent que D_0 est inversement proportionnel à la taille a des inclusions. (D_0 suit une variation en 1/a comme dans la théorie de Stokes-Einstein) (Gambin et al. 2006). L'origine de cette déviation pourrait être liée aux interactions spécifiques entre des protéines et des lipides (Phillips et al. 2009). Cette déviation suscite un grand débat dans la communauté des biophysiciens en ce moment. Dans ce projet je ne m'intéresse pas aux effets liés à la taille des protéines mais à ceux liés à la fraction surfacique/ densité des protéines dans la membrane. Donc, je ne détaillerai pas plus les débats sur la dépendance du coefficient de diffusion avec la taille des protéines.

Au fil des ans, les modèles de Singer et Nicolson et de SD ont été profondément modifiés et améliorés pour prendre en compte les structures très complexes des membranes biologiques. C'est ce que nous allons voir dans les sections suivantes

II.2.3.2 **Diffusion et modèle de Singer et Nicolson modifié pour tenir compte de l'organisation des membranes**

Comme je l'ai mentionné précédemment, dans le modèle membranaire initial de Singer et Nicolson, les protéines membranaires diffusent librement sur toute la cellule. Cependant, avec la découverte de l'existence des "radeaux lipidiques", "rafts" (Simon and Ikonen, 1997) (Lingwood and Simons 2010) (Sezgin et al. 2017) (voir le paragraphe II.2.1.5 pour des

détails) et la mise en évidence de la complexité membranaire, il a fallu prendre en compte le fait que certaines protéines membranaires ne sont pas libres de diffuser librement. En effet, différentes restrictions à la mobilité des protéines ont été observées (Figure 31). Les protéines qui ont plus d'affinité pour les microdomaines que pour le reste de la membrane s'accumulent dans les "radeaux" (Figure 31-A). Comme proposé par le modèle de "barrières et piquets" de Kusumi (Cf § II.2.1.6), le cytosquelette d'actine peut aussi constituer une barrière à la diffusion des protéines membranaires. En effet, celles qui possèdent des domaines intracellulaires longs sont incapables de traverser la barrière composée de filament du cytosquelette (Figure 31-B). En revanche, des protéines qui ont des domaines intracellulaires courts arrivent à passer la barrière et peuvent être recrutées dans des micro-domaines pour lesquelles elles ont une affinité (Figure 31-C). Enfin, il a été montré que des clusters de protéines ont un coefficient de diffusion beaucoup plus faible que celui des protéines monomériques (Figure 31-D). Tout comme le modèle de Singer et Nicolson, le modèle de SD aussi a subi de profondes modifications et a été amélioré pour prendre en compte ces effets.

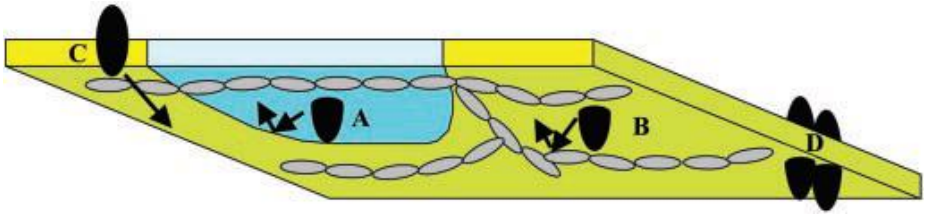


Figure 31 : Différents types de restriction des protéines dans la membrane plasmique (vue de la face cytoplasmique). A) Affinité des protéines pour les micro-domaines lipidiques. Ces protéines sont confinées dans les micro domaines si l'énergie d'activation pour passer la barrière du domaine est supérieure à l'énergie cinétique des protéines. B) Les protéines dont les domaines intracellulaires sont longs sont incapables de traverser la barrière constituée des filaments du cytosquelette. C) Celles avec de courts domaines intracellulaires traversent la barrière. D) Clusters de protéines avec une diffusion réduite par rapport aux protéines monomériques (Vereb et al. 2003).

II.2.3.3 **Principaux facteurs géométriques, mécaniques et chimiques qui affectent la dynamique des protéines**

Les modèles de Singer et Nicolson et de SD ne tiennent pas compte des principaux facteurs géométriques, mécaniques et chimiques pertinents de la membrane et des interactions entre les inclusions (protéines ou lipides) et la membrane. Or ces facteurs peuvent influencer d'une manière ou d'une autre la dynamique des protéines. Le but de cette section est d'énumérer ces principaux facteurs (Voir (Démery and Lacoste 2018) pour une revue).

Propriétés des membranes

a) Propriétés géométriques de la membrane : le paramètre géométrique le plus basique de la membrane est *son épaisseur*. Pour les membranes lipidiques in vitro, ce paramètre est généralement supposé être constant de l'ordre de 4 à 5 nm. Cependant, les membranes biologiques sont intrinsèquement hétérogènes et contiennent des micro-domaines lipidiques d'épaisseur différente du reste de la membrane. Dans de tels systèmes, l'épaisseur de la membrane peut donc varier d'un point à l'autre des membranes. Une autre propriété géométrique locale très importante de la membrane est *sa courbure*. Une préférence de certaines protéines membranaires pour la courbure de la membrane signifie en particulier qu'il est possible de les trier selon la courbure locale comme décrit dans (Aimon et al. 2014). Il a d'ailleurs été montré que le coefficient de diffusion de protéines membranaires dans des nanotubes de membrane diminue quand la courbure du tube augmente (Domanov et al. 2011).

b) Propriétés mécaniques et chimiques de la membrane : En ce qui concerne les propriétés mécaniques de la membrane, on peut citer les modules élastiques de la membrane, tels que son module de courbure, et sa tension ainsi que ses modules dissipatifs, tels que la viscosité de la membrane et la friction relative entre les feuillets membranaires. Les propriétés chimiques comprennent la composition chimique de la membrane, qui contrôle plusieurs de ses propriétés mécaniques. Les deux paramètres doivent être considérés comme locaux ou globaux en fonction du niveau d'hétérogénéité membranaire.

Propriétés des protéines membranaires

a) Propriétés géométriques de la protéine : Les paramètres géométriques de la protéine comprennent sa taille et sa forme (Z. Liu et al. 2009) (Camley and Brown 2013) (Chang et al. 1998) (Aimon et al. 2014). Sa forme définit notamment sa courbure spontanée, qui est un scalaire pour les inclusions isotropes mais devient un tenseur pour les anisotropes.

b) Propriétés mécanique de la protéine : Les propriétés mécaniques incluent sa conformité, qui peut être divisée en modules élastiques et modules dissipatifs.

Propriétés du solvant

Le solvant dans lequel les protéines et la membrane sont intégrées est principalement caractérisé par sa viscosité qui contrôle la partie hydrodynamique de la dissipation. Dans le cas où la membrane et son solvant sont confinés par des parois rigides, le solvant sera également décrit par son épaisseur, ce qui peut affecter la mobilité des protéines membranaires (Seki et al. 2011) (Stone and Ajdari 1998).

Présence d'autres protéines

D'autres inclusions présentes dans la membrane modifient la mobilité d'une protéines, par des interactions directes telles que des répulsions électrostatiques par exemple, ou indirecte telles que les interactions médiées par la membrane (M. Goulian et al. 1993) (Reynwar and Deserno 2008). Comme à l'échelle microscopique, les membranes biologiques sont un mélange de protéines membranaires et de partenaires lipidiques, les effets collectifs sont importants.

Afin de comprendre comment ces différents facteurs affectent la mobilité d'une protéine, il est important de se concentrer sur le mécanisme par lequel la protéine interagit avec la membrane. Les principaux mécanismes de couplage sont :

Couplage hydrodynamique : Puisque la protéine évolue dans la membrane qui est fluide, il existe un couplage hydrodynamique dû à la membrane fluide. Toutefois, comme le fluide externe peut être entraîné par le mouvement des lipides induit par la protéine, il existe également un couplage hydrodynamique avec le fluide externe, qui est généralement de l'eau. C'est le couplage considéré par Saffman et Delbrück (Saffman and Delbrück 1975) et dans (Seki et al. 2011) (Stone and Ajdari 1998).

Couplage à la courbure locale de la membrane : La courbure spontanée de la protéine induit une déformation des lipides autour de la protéine, entraînant une pénalité énergétique (M. Goulian et al. 1993), (Reister and Seifert 2005), (Reynwar et al. 2007), (Naji et al. 2009), (Quemeneur et al. 2014). Ce couplage dépend de la nature et de la "forme" de la protéine et en particulier si la protéine est "dure ou molle".

Couplage à l'épaisseur de la membrane. Un déséquilibre hydrophobe entre la protéine et l'épaisseur de la membrane dilate ou comprime les queues des lipides autour de la protéine (Andersen et al. 2007).

Couplage à la composition de la membrane. Un tel effet existe lorsque la protéine a une affinité particulière pour un type de lipides dans le mélange de divers lipides (Reynwar et al. 2007) .

Couplage électrostatique. Divers mécanismes sont possibles, selon que les protéines et les lipides soient chargés ou non. Il faut noter que, même si les lipides ne sont pas chargés, de tels

couplages peuvent être présents car les lipides peuvent être polarisés localement par la protéine si celle-ci est chargée. Pour les canaux ioniques membranaires, il existe généralement un couplage d'origine électrostatique (Phillips et al. 2009) en présence du potentiel transmembranaire.
Couplage dû aux effets géométriques. Cette forme de couplage existe parce que les trajectoires réelles des protéines membranaires se produisent en 3D alors que ces trajectoires sont typiquement enregistrées expérimentalement sur un plan (Reister and Seifert 2005), (Reister-Gottfried et al. 2007). Cette projection de trajectoires réelles sur l'espace 2D entraîne une réduction supplémentaire apparente de la mobilité des protéines.

Naturellement, une protéine donnée peut se coupler à la membrane via plusieurs types de couplage simultanément. Dans la section suivante, nous allons présenter des modèles théoriques post-SD qui tiennent compte des couplages non-hydrodynamiques et leurs conséquences sur la dynamique des protéines.

II.2.3.4 **Modèles théoriques post- SD**

Dans la théorie de SD la protéine diffuse dans une membrane plane et celle-ci demeure non affectée par la présence de la protéine. Les modèles récents de diffusion ont été en partie suscités par les expériences de Gambin et al (Gambin et al. 2006) qui avaient publié des expériences où la diffusion de peptides et de protéines trans-membranaires ne variait pas logarithmiquement avec la taille de ces inclusions a, mais comme 1/a. Il avait été alors proposé par Naji et al.(Naji et al. 2007) que cette différence pouvait être due à la déformation locale significative de la membrane due à l'interaction entre la protéine et la bicouche lipidique. Ces auteurs avaient proposé qu'une protéine membranaire devrait subir une dissipation supplémentaire, soit dans la membrane, soit dans le fluide externe, en raison de la déformation locale qu'elle crée alors qu'elle diffuse dans la membrane. Le but de cette section est de donner tout d'abord l'argument théorique original avancé par Naji et al pour expliquer la façon dont la présence des protéines perturbe la membrane notamment sa composition lipidique, son épaisseur ou sa hauteur. Ensuite, les différents modèles prenant en compte différentes origines pour la déformation de la membrane et la rétroaction de l'objet diffusant appelé « effet de polaron » par analogie au mouvement d'électron dans un réseau. Puis nous allons expliquer comment ce modèle de polaron est appliqué au couplage spécifique de la courbure de la membrane et utilisé pour analyser les expériences de (Quemeneur et al. 2014). Enfin, nous terminerons avec le modèle plus complet au-delà de SD.

II.2.3.4.1 Modèles associés à la perturbation de la membrane

Naji et al. ont essayé de comprendre l'écart entre la prédiction SD (Saffman and Delbrück 1975) et le résultats expérimentaux de Gambin et al. (Gambin et al. 2006). Ils ont proposé que cet écart pourrait être attribué à des perturbation de la membrane telles que sa composition lipidique, son épaisseur ou sa hauteur (Naji et al. 2007). Ils ont supposé que la membrane était déformée par la présence de la protéine et calculé les conséquences sur les mouvements du fluide environnant, sur ceux des lipides dans la membrane et finalement sur la mobilité de la protéine (Figure 32).

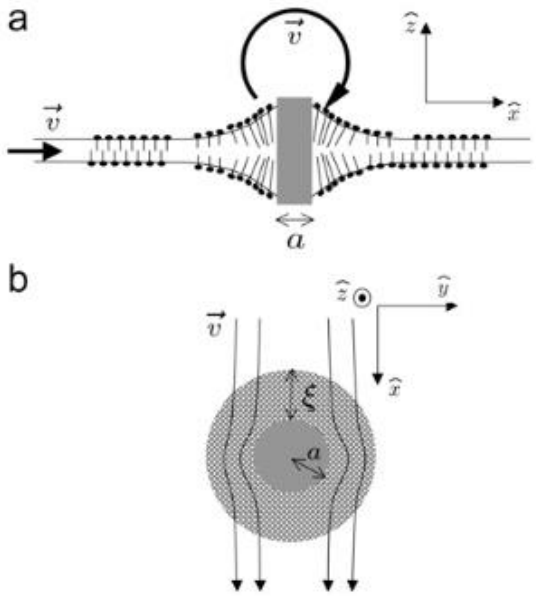


Figure 32: (A) Vue latérale de la membrane avec une protéine intégrale (gris foncé), qui crée une déformation (bosse) générant des flux supplémentaires dans le solvant (flèches solides), ce qui entraîne une dissipation supplémentaire dans la membrane. (B) Vue de dessus de la membrane montrant la protéine (gris foncé) et la membrane perturbée qui l'entoure (partie grisée hachurée) (d'après (Naji et al. 2007)).

Si l'échelle de la perturbation (ξ sur la Figure 32) est faible devant la taille *a* de la protéine, ils ont montré que le coefficient de friction associé à cet effet λ_ϕ est proportionnel à *a*, $\lambda_\phi = \Gamma a$. Le coefficient de diffusion devient donc :

$$D = \frac{k_B T}{(\lambda_{SD}+\lambda_\phi)} = \frac{k_B T}{(\lambda_{SD}+ \Gamma a)} \qquad (18)$$

où λ_{SD} est le coefficient de friction du modèle SD. On voit alors que si la perturbation domine, le coefficient de diffusion est de la forme D = 1/a, ce qui est compatible avec les expériences de Gambin et al.

Différents modèles prenant en compte différentes origines pour la déformation de la membrane ont été développés ces dernières années. Ils prennent généralement en compte le fait que la protéine déforme localement la membrane et que la rétroaction sur l'objet diffusant se traduit par une modification du coefficient de friction. Des analogies physiques ont été faites avec l'effet de polaron qui a été décrit à l'origine pour un mouvement d'électrons dans un réseau (Landau 1933). Un polaron est un transporteur de charge qui déforme le réseau environnant et se déplace donc dans un champ de polarisation induit. Ce modèle de polaron a été appliqué à la diffusion des protéines membranaires (Démery and Dean 2010). Ces auteurs ont montré qu'il existe des régimes où l'expression (18) s'applique et où la nature du couplage λ_ϕ entre protéine et membrane va influencer directement la diffusion.

Dans la suite nous allons montrer comment ce type de modèle a été appliqué à KvAP, une protéine de forte affinité pour la courbure.

II.2.3.4.2 Application du modèle de polaron à KvAP, une protéine qui déforme localement la membrane.

Nous allons présenter ici l'application du modèle de Polaron au canal potassique bactérien voltage dépendant KvAP.
Il a été montré dans notre laboratoire (Quemeneur et al. 2014) que KvAP qui a une forte affinité pour la courbure (Aimon et al. 2014) déformait localement la membrane. Cette déformation affectait fortement la diffusion de KvAP par rapport à celle de l'AQP0, une autre protéine ne présentant aucune affinité pour la courbure (Aimon et al. 2014) et qui elle n'était pas affectée. Pour essayer de comprendre cette différence significative, le modèle de polaron a été utilisé pour développer un nouveau modèle par D Lacoste par la partie analogique et P Auberger pour la partie simulation. Ils ont considéré une protéine unique de taille *a* déformant localement la membrane et diffusant dans la membrane de taille *L* telle que L ≫ a. L'hamiltonien d'Helfrich a été modifié pour prendre en compte la déformation locale de la membrane due à la protéine

$$\mathcal{H}_0[\mathrm{h},\mathbf{R}]=\frac{\kappa}{2}\int \mathrm{d}^2\mathrm{r}\left[(\nabla^2\mathrm{h})^2+\frac{\Sigma}{\kappa}(\nabla\mathrm{h})^2-\Theta\mathrm{G}(\mathbf{r}-\mathbf{R})\nabla^2\,\mathrm{h}\right] \qquad (19)$$

Où les deux premiers termes représentent l'énergie de courbure et l'énergie élastique de la bicouche avec le module associé κ et la tension Σ, et le dernier terme modélise la courbure de la membrane induite par la protéine au point **R**, qui dépend du temps. La courbure (Θ) varie de façon linéaire avec la courbure spontanée de la protéine C_p, $\Theta = 4\pi a^2 C_p$. À partir de cette approche, les auteurs ont calculé le profil de la membrane qui a une largeur caractéristique latérale $\xi = \kappa/\Sigma$ (lignes solides sur la Figure 33-A). Les profils tridimensionnels de membrane obtenus à partir de simulations numériques pour trois tensions différentes sont présentés sur la sur la Figure 33-B (d'après (Quemeneur et al. 2014)). On voit donc que le profil de la déformation dépend directement de la tension membranaire. En particulier, la hauteur et la largeur de la déformation sont fixées par la tension membranaire.

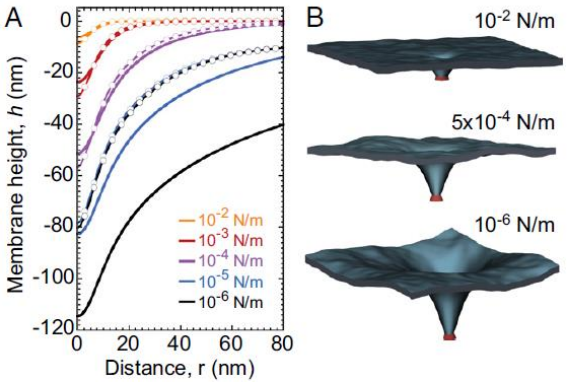


Figure 33 : Forme membranaire en fonction de la tension. (A) Profil calculé à partir de l'hamiltonien d'Helfrich modifié, avec $\Theta = 3.5 \times 10^{-7}$ m, $\kappa = 20\ k_BT$, et $a = 4$ nm (lignes solides). Profil calculé numériquement en minimisant l'énergie (ligne pointillée). (B) Profils tridimensionnel de membrane obtenus à partir de simulations numériques pour trois tensions différentes (d'après (Quemeneur et al. 2014)).

Ils ont alors calculé le rôle de la déformation locale de la membrane sur la dynamique de la protéine. En supposant que la dynamique de la membrane est contrôlée par l'hydrodynamique dans le fluide environnant de viscosité η, ils ont pu montrer, en s'inspirant du modèle développé dans (Démery and Dean 2010), que la courbure affectait le coefficient de diffusion

des protéines et que le coefficient D_0 correspondant à la diffusion dans une membrane quasi-plane, considérée par SD, devenait alors D_{eff}:

$$\frac{D_0}{D_{eff}} = 1 + \frac{\eta D_0 \Theta^2 W_0(\sigma)}{2ak_B \mathrm{T}} \tag{20}$$

où $W_0(\sigma)$ est une fonction donnée par l'équation S27 dans (Quemeneur et al. 2014).

Des expériences de Single Particle Tracking (Cf § IV.2.3) ont ensuite été réalisées sur 2 types de protéines: KvAP qui déforme la membrane et pour référence, l'aquaporine 0 (AQP0) qui a une forme globalement cylindrique et ne déforme pas la membrane. La déformation de la membrane augmentant quand la tension diminue, on s'attend donc à observer des différences plus importantes sur la diffusion de ces protéines à faible tension. On voit sur la Figure 34 que c'est le cas. Quémeneur et al ont ainsi pu montrer qu'à des tensions élevées, les corrections dues à la forme de KvAP étaient très faibles (~ 5%), tandis qu'à des tensions plus faibles, les corrections étaient beaucoup plus prononcées (~ 40%). La dépendance avec la tension de D_{eff} est illustrée à la Figure 34 calculée à partir de l'équation (20) ainsi que les données expérimentales et les données de simulation (Quemeneur et al. 2014).

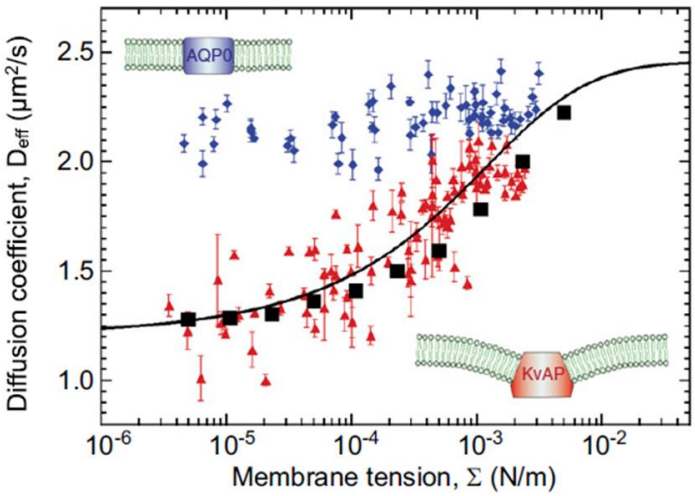


Figure 34 : Mobilité latérale des protéines dans les membranes fluctuantes. Tracé semi logarithmique des coefficients de diffusion (D_{eff}) en fonction de la tension de la membrane Σ, pour AQP0 (◆) et KvAP (▲). Les données KvAP ajustées par l'équation (20) (ligne continue) donne un coefficient de couplage protéique $\Theta = 3.5 \times 10^{-7}$ m, considérant a = 5 nm, $\kappa = 20\ k_BT$ et $D_0 = 2.5\ \mu m^2.s^{-1}$. Des simulations de la diffusion de protéines sur une membrane soumise à des fluctuations thermiques (■) correspondent bien aux données expérimentales et à la théorie. (Inserts) Schémas de déformation de la membrane due à la présence des protéines (Quemeneur et al. 2014).

Néanmoins, avec un modèle de polaron où la dissipation a lieu essentiellement dans le milieu aqueux environnant, les auteurs avaient obtenu un coefficient de couplage incompatible avec les expériences de (Aimon et al. 2014). Les auteurs avaient donc exploré des mécanismes de dissipation supplémentaires, en particulier la friction intra-membranaire entre les 2 feuillets de la bicouche. Un modèle plus complet a ensuite été développé par Morris et Turner (Morris and Turner 2015) qui prend en compte le fait que les membranes sont elles-mêmes des fluides incompressibles, satisfaisant une forme bidimensionnelle de l'équation de Stokes et que le mouvement de la protéine impose des conditions limites particulières sur le flux de la membrane (et le flux de la membrane, à son tour, impose des conditions sur le flux de fluide

environnant). A l'heure actuelle, c'est le seul modèle complet qui décrit les effets non pris en compte par SD.

Dans toutes les sections précédentes la fraction surfacique ou la densité des protéines (Φ) des protéines est très faible. Dans ce projet, je m'intéresse aux effets de la densité des protéines sur leur diffusion et celles des lipides. La question est la suivante : Que prédit la théorie pour la diffusion des protéines dans un environnement très encombré en protéines ? C'est à cette question que nous allons répondre dans la section suivante

II.2.3.5 **Diffusion dans un environnement encombré en protéines**

a) Modèles analytiques

Comme je l'ai mentionné au paragraphe II.2.1.3 les membranes cellulaires sont très encombrées de protéines.
A trois dimensions (3D), le papier original d'A. Einstein (Einstein 1956) prédit que la viscosité effective du milieu augmente par rapport à la viscosité du milieu dilué μ_b avec la fraction volumique Φ_b d'objets diffusants de la façon suivante:

$$\mu^{\text{eff}} = \mu_b\ (1 + 2.5\ \Phi_b) \tag{21}$$

Ce qui donne une variation pour le coefficient de diffusion $D(\Phi_b)$ par rapport à la situation diluée D_0:

$$\frac{D(\Phi_b)}{D_0} = \frac{1}{(1 + 2.5\Phi_b)} \tag{22}$$

Dans une membrane à 2D, la variation de la viscosité effective (μ^{eff}) de la membrane en présence d'inclusions cylindriques par rapport à sa viscosité en absence de protéines (μ_m) a été calculée avec une approche similaire à celle d'Einstein par (Belzons et al. 1981) et par la suite par (Brady 1983):

$$\mu^{\text{eff}} = \mu_m\ (1 + 2\ \Phi) \tag{23}$$

avec

$$\mathrm{D}(\Phi) = \frac{k_B \mathrm{T}}{4\pi\mu^{eff}}\left[\log(\frac{l}{a}) - \gamma\right] \tag{24}$$

Ce qui donne :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{(1+2\Phi)} \approx 1 - 2\Phi \text{ si } \Phi \text{ reste faible} \tag{25}$$

Dans un environnement riche en protéines et en augmentant progressivement Φ, on s'attend donc à mesurer une diminution de D/D_0.

Un modèle plus complet a été proposé par Abney et al basé sur la théorie des fluides mais négligeant les effets hydrodynamiques (Abney et al. 1989). La variation prédite pour la diffusion est:

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - 2\Phi$$

Enfin, un calcul complet de Bussell et al prenant cette fois en compte les effets hydrodynamiques liés au mouvement des protéines et valable quand les densités ne sont pas trop élevées, prévoit une variation plus forte du rapport des coefficients de diffusion, qui va dépendre du paramètre ε de SD (Bussell et al. 1994):

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - 2\Phi\big(1 - f(\varepsilon)\big)$$

avec $f(\epsilon) \approx \frac{1+ln(2)-9/32}{(ln(\varepsilon)-\gamma)}$, et γ étant la constante d'Euler (=0.577216).

Dans le cas des lipides, on s'attend à avoir ε grand, et donc $\frac{D(\Phi)}{D_0} \approx 1 - 2\Phi$

b) Simulations numériques

Des méthodes de simulation numérique, atomiques et gros grain, ont été aussi utilisées pour étudier l'effet de l'encombrement de protéines sur la diffusion latérale des lipides et des protéines membranaires. Javanainen et al ont ainsi simulé la diffusion du canal NaK dans 2 types de membranes lipidiques, constituées soit de DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) ou de DLPC (dilinoleoylphosphatidylcholine) (Javanainen et al. 2013). Dans DPPC, à cause du différentiel de longueur entre les chaines hydrophobes des lipides et la hauteur de la protéine ("mismatch hydrophobe"), la protéine forme des agrégats (colonne de gauche sur la Figure 35) alors que ce n'est pas le cas dans la membrane de DLPC (colonne de droite sur la Figure 35). Ces différences d'agrégation ont été observées à différentes fractions molaires protéines:lipides (Figure 35)

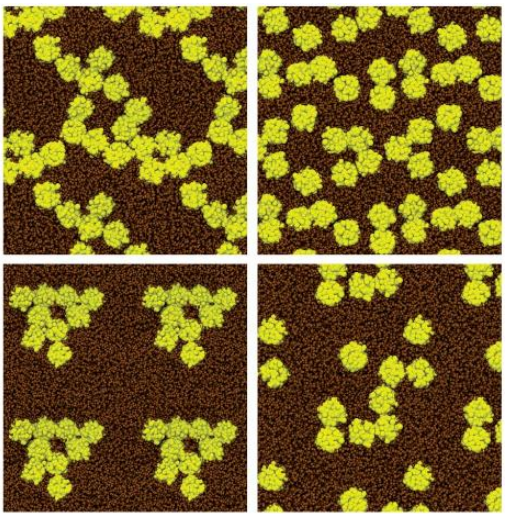


Figure 35 : Simulation MARTINI de bicouches contenant le canal NaK dans deux types de bicouches: DPPC (colonne de gauche) et DLPC (colonne de droite), pour deux rapports molaires protéines:lipides 1: 50 (haut) et 1: 100 (bas). Les protéines sont colorées en jaune et les lipides en brun (Javanainen et al. 2013).

Les coefficients de diffusion ont été mesurés dans les 2 cas à partir de ces simulations. Les auteurs ont ainsi montré que le coefficient de diffusion des lipides est systématiquement plus faible pour le DPPC et qu'il décroit linéairement avec la densité de protéines dans les 2 types de membrane (Figure 36). Par contre, la diffusion des protéines chute beaucoup plus vite dans la membrane de DPPC où la protéine forme des agrégats que dans celle de DLPC où elle n'en forme pas. Ces résultats tendent à prédire des effets importants de la présence d'agrégats sur la diffusion dans les membranes.

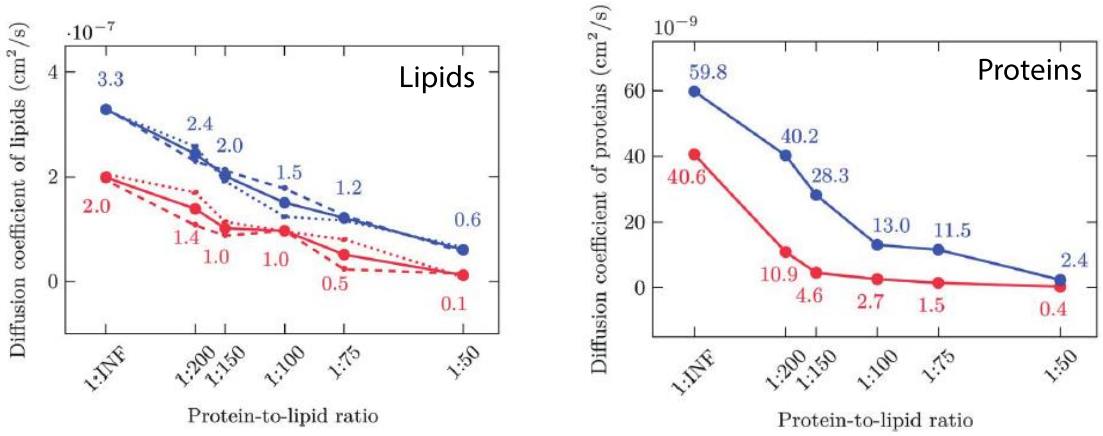


Figure 36 : Coefficient de diffusion des lipides (gauche) et des protéines NaK (droite) dans une bicouche de DPPC (rouge) et de DLPC (bleu) en fonction du rapport molaire protéines:lipides (Javanainen et al. 2013)

c) Effet des obstacles sur le coefficient de diffusion

Dans les membranes cellulaires, la liaison de certaines protéines au cytosquelette ou la présence de rafts jouent le rôle d'obstacles fixes ou faiblement mobiles pour des particules diffusant dans l'environnement membranaire local (Sevcsik et al. 2015) (Deverall et al. 2005) (Lin and Brown 2004) (Kusumi et al. 2012). Dans le cas où une très forte concentration de protéines et d'agrégats sont présents dans une membrane, ces effets doivent aussi être pris en compte.

Des simulations de Monte Carlo ont été utilisées pour étudier l'effet des obstacles fixes sur le coefficient de diffusion (Saxton 1987). Saxton a ainsi défini un seuil de percolation c_p pour les obstacles: il correspond à la plus haute densité d'obstacles pour laquelle il existe une trajectoire sans piège pour les objets diffusant. Dans le cas d'obstacles fixes (Figure 37) on voit clairement que lorsque la concentration des obstacles est en-dessous de ce seuil de percolation (pour un maillage carré, c_p= 0.41) les particules diffusent normalement, mais le coefficient de diffusion diminue avec la densité des obstacles (Figure 37 A). Au-dessus du seuil, le mouvement n'est plus du tout diffusif et les particules restent piégées dans des zones dont la surface moyenne est donnée par la limite du MSD à temps long (Figure 37 B).

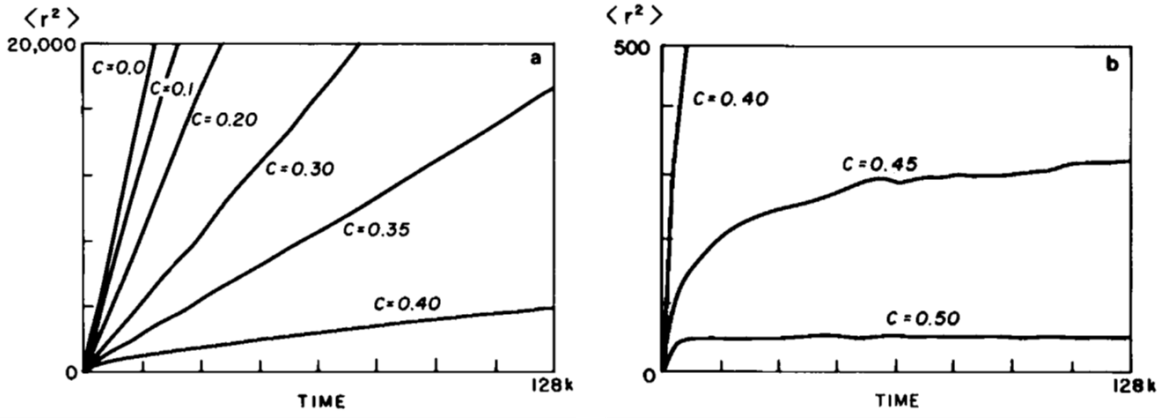


Figure 37 : Effet d'obstacles fixes sur la diffusion membranaire obtenu par simulation de Monte Carlo sur un réseau de maille carrée. Déplacements quadratiques moyens ($\langle r^2 \rangle$) en fonction du temps pour différentes concentrations d'obstacles c. (A) correspond au cas où c < c_p, la concentration seuil de percolation (c_p = 0.41 pour ce type de réseau) (B) correspond au cas où c ≥ c_p, et où le mouvement est confiné (Saxton 1987).

L'effet des obstacles mobiles sur le coefficient de diffusion relatif ($D^* = D(c)/D_0$) a aussi été calculé. On attend un comportement diffusif à temps long mais D^* doit dépendre à la fois de la fraction surfacique d'obstacles c et du rapport des mobilités des objets diffusants et des obstacles γ (en pratique, du rapport des taux de saut des 2 espèces sur le réseau) : D*(c, γ). Contrairement aux obstacles immobiles, lorsque la fraction de surface c est fixée, les obstacles mobiles ne ralentissent pas forcément la diffusion. Au contraire on peut voir sur la Figure 38 une large augmentation de $D^*(c, \gamma)$ quand γ va de ∞ (pour les obstacles fixes) à 1 (pour les obstacles mobiles, de même mobilité que les traceurs). Ainsi, il a été montré que pour c = 0.3, D^* augmente de 0.27 (fixes) à 0.58 (mobiles, γ = 1) et que pour c = 0.5 (> c_p pour les obstacles immobiles), D* = 0.36 dans le cas d'obstacles mobiles (γ = 1) alors que D^* = 0 pour les obstacles fixes.

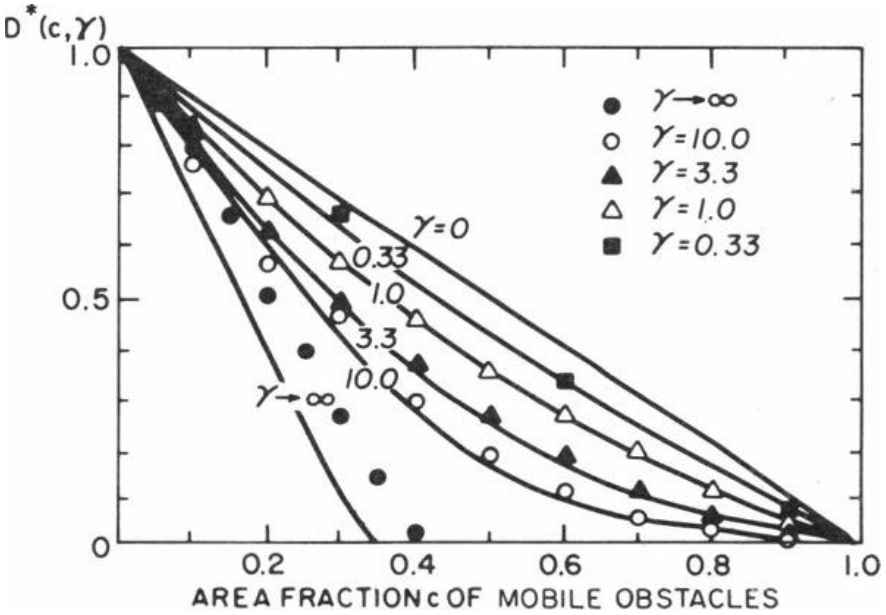


Figure 38 : Effet d'obstacles mobiles sur le coefficient de diffusion relatif D*. Coefficient de diffusion en fonction de la fraction de surface c et du taux de saut relatif γ. γ=∞ correspond aux obstacles fixes et γ=1 au cas où obstacles et traceurs ont les mêmes mobilités.

Enfin, il a fait varier la taille du traceur et donc considéré la diffusion de protéines de taille allant de 0 à 16 (en unités de maille du réseau) en fonction de la densité de protéines (voir Figure 39). On voit clairement que *D*(c)* change considérablement de R = 0 (lipide) à R = 1. En revanche, pour R variant de 1 à 4, *D*(c)* dépend très faiblement de R. Dans ces conditions, un ajustement des moindres carrés de ces simulations donne au premier ordre en c ou Φ (fraction surfacique de protéines), la variation de diffusion relative :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - 2.12\Phi \qquad (26)$$

Avec $\Phi \leq 0.65$ (Saxton 1987).

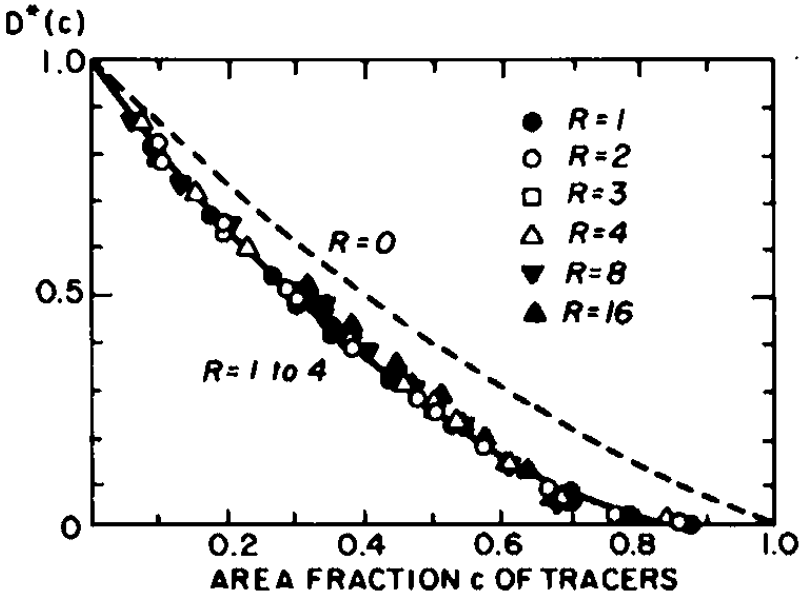


Figure 39 : Coefficient de diffusion relatif *D* * en fonction de la fraction de surface c des traceurs pour les points (R = 0, correspondant aux lipides) et les hexagones de rayon R = 1-16 (les protéines) sur un réseau triangulaire. Ligne pointillée : courbe théorique pour R = 0 à partir des équations (4-6 dans (Saxton 1987). Ajustement des moindres carrés (ligne pleine) pour R = 1-4 à partir de l'équation (26) (Saxton 1987).

Une variation similaire a été obtenue à partir de simulations numériques prenant en compte des effets de gêne stérique par (Pink 1985).

En conclusion, les différents modèles prévoient une variation de $\frac{D(\Phi)}{D_0}$:

- en $\frac{1}{(1+2\Phi)}$ pour un modèle prenant en compte simplement une viscosité effective de la membrane
- en $1-2\phi$ si on prend en compte des effets de volume exclus mais on néglige les effets hydrodynamiques (Abney et al. 1989)
- en $1-2.12\phi$ à partir de simulations numériques (Saxton 1987) (Pink 1985)
- en $1-A\,\phi$, en prenant compte les interactions hydrodynamiques, avec A>2 pour les protéines membranaires (A=2.43 d'après les estimations de (Bussell et al. 1994)) et A=2 pour la diffusion des lipides

d) Mesures expérimentales de l'effet d'encombrement

Différents travaux expérimentaux ont été effectués pour étudier l'effet de la densité des protéines et de la température sur la diffusion des lipides et des protéines. Des expériences de microphotolyse de fluorescence (une sorte de mesure de FRAP) ont été réalisées dans les années 80 sur des vésicules probablement multilamellaires afin de mesurer la diffusion des lipides et protéines dans une membrane contenant la pompe à protons photoactivable bacteriorhodopsine (BR) reconstituée dans une membrane formée de DMPC (avec 2 chaînes en C14 saturées). Il a été montré qu'au-delà de la température de transition de phase (T_c = 23°C), le coefficient de diffusion des lipides (Figure 40A) et des protéines (Figure 40B) diminuent systématiquement quand on augmente la densité de la BR dans la membrane. Par contre, en dessous de T_c, la présence des protéines augmente le coefficient de diffusion de lipides et de protéines (Figure 40A) (Peters and Cherry 1982). Il est important de souligner que les densités de surface utilisées étaient très élevées, Φ variant de 20 à 54%. Dans ces conditions, comme je le décrirai plus en détail au §V.3.3, Gulik et al. avaient montré que la

BR, même en absence de lumière, forme spontanément une grande quantité d'agrégats protéiques (Gulik-Krzywicki et al. 1987). Il est même possible qu'à Φ = 54%, la BR soit proche d'un état cristallin, ce qui expliquerait la chute de près d'un ordre de grandeur du coefficient de diffusion entre 28 et 54%. Ces conditions très particulières de concentration et d'agrégation rendaient donc délicate la comparaison avec les modèles théoriques.

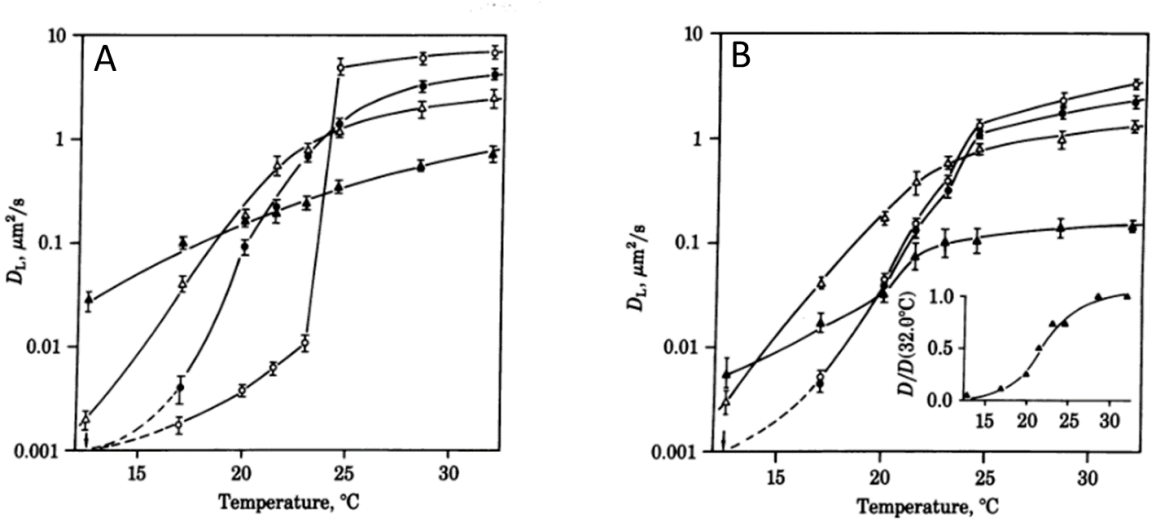


Figure 40 : (A) Diffusion de lipides dans la membrane à base de DMPC où la bacteriorhodopsine (BR) a été reconstituée, en fonction de la fraction surfacique en protéines (Φ). Φ = 0 et 20% (cercles non remplis et remplis) ; Φ = 33% (triangle non rempli) ; Φ = 54% (triangle rempli). (B) Diffusion de la BR en fonction de la densité en protéine (Φ). Φ = 14 % (cercles non remplis) ; Φ = 20% (cercle rempli); Φ = 28% (triangle non rempli); Φ = 54% (triangle rempli) (Peters and Cherry 1982).

Dans la même année, Tank et al. avaient effectué des mesures de FRAP sur le polypeptide transmembranaire, la gramicidine C, en fonction de la température et de la concentration en protéines (Tank et al. 1982). Ils avaient aussi observé qu'au-dessus de la température de transition des lipides de la membrane, le coefficient de diffusion des lipides et du polypeptide diminuaient quand ils augmentaient la densité de celui-ci dans la membrane. Pour le peptide, ils avaient observé 2 régimes avec un cross-over à environ 1 % (mol:mol Proteine:lipide) avec une diminution rapide avec la densité au-delà de cette valeur. La formation d'agrégats protéiques avait été proposée comme une raison possible de ce comportement.

Les effets de la densité des protéines sur leur diffusion et sur celle des lipides environnants ont également été observés par Ramadurai et al. En effet, ils ont utilisé le FCS pour mesurer la dynamique latérale de différentes protéines membranaires (GltT, LacS et LacY) et des lipides dans des GUVs à base de DOPC/DOPG (3:1) en fonction de la densité des protéines. Ils ont montré que la dynamique latérale des protéines et des lipides diminue lorsque la concentration des protéines augmente (jusqu'à environ 3000 protéines par micromètre carré) (Ramadurai et al. 2009) (Figure 41). Ces expériences étaient bien plus contrôlées que dans la référence précédente (Tank et al. 1982).

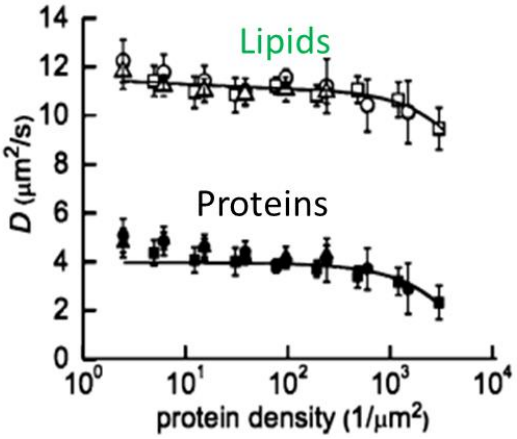


Figure 41 : Mesure par FCS du coefficient de diffusion (*D*) des lipides et des protéines en fonction de la densité en protéines (le transporteur du glutamate trimérique, GltT, carrés pleins ; le transporteur de lactose dimérique, LacS, cercles pleins ; la lactose perméase monomère, LacY, triangles pleins. Les lipides correspondent aux symboles vides. (Ramadurai et al. 2009).

II.2.4 Etat de l'art expérimental des mesures de diffusion à ce jour

II.2.4.1 **Comment mesure-t-on le coefficient de diffusion des lipides et des protéines (dans des systèmes modèles) ?.**

Comme je l'ai mentionné plus haut, la membrane peut être considérée comme un fluide à 2 dimensions dans lequel les lipides et les protéines diffusent librement suivant le mouvement brownien. De nos jours, il existe trois grandes méthodes expérimentales de mesure du coefficient de diffusion des lipides et des protéines dans les membranes, in vivo ou in vitro :

- Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP),
- La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS),
- Le suivi de particule unique (single particule tracking ou SPT) ou de molécule unique (single molecule tracking ou SMT)

Ces méthodes ont fait l'objet de revues récentes (Rayan et al. 2010) (Bates et al. 2006) (Owen et al. 2009) (Macháň and Hof 2010). Ces méthodes sont utilisées sur des montage de microscopie optique et utilisent les propriétés de fluorescence des objets. Les méthodes de FRAP et FCS réalisent une mesure moyenne, alors que les SPT et SMT suivent des molécules uniques et permettent une caractérisation détaillée de sous-populations (Marguet et al. 2006). Nous allons décrire les principes généraux des trois méthodes.

II.2.4.1.1 Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) est une méthode très populaire, ancienne, largement utilisée et accessible sur la plupart des microscopes confocaux (Axelrod et al. 1976) (Vaz and Dieter 1983) (Davoust et al. 1982) (Yguerabide et al. 1982) (Almeida et al. 1992) (C. Liu et al. 1997). Le FRAP permet de mesurer la mobilité latérale bidimensionnelle des molécules fluorescentes. En pratique, une petite zone sur la surface fluorescente, appelée « région d'intérêt » (ROI) de taille connue et en général circulaire, est photoblanchie (bleachée) pendant un temps court par une brève exposition à un intense

faisceau laser concentré. Le recouvrement de la fluorescence est alors mesuré dans cette même zone, en utilisant le même faisceau laser, mais très atténué. Les coefficients de transport sont déterminés en mesurant le taux de récupération de la fluorescence ($f_k(t)$) qui résulte du transport, par diffusion et/ou écoulement, du fluorophore dans la région bleachée à partir de parties non bleachée du système (voir Figure 42). $f_k(t)$ est donné par (Guo et al. 2008):

$$f_k(t) = \frac{F_k\,(\mathrm{t}) - F_k\,(0)}{F_k\,(\infty) - F_k\,(0)} \tag{27}$$

Où $F_k\,(\mathrm{t})$ est l'intensité de fluorescence après recouvrement en fonction du temps.

Les courbes de récupération fractionnée obtenues sont ensuite ajustées avec un modèle prenant en compte les conditions d'illumination du disque uniforme (Figure 42 A). L'équation du modèle est de la forme :

$$f(t) = e^{-\frac{2\tau_D}{t}} \left[I_0\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) \right] \tag{28}$$

Où I_0 et I_1 sont les fonctions de Bessel modifiées et τ_D le temps caractéristique du recouvrement (Guo et al. 2008).

A partir de l'équation (28) on peut relier τ_D au coefficient de diffusion D via la formule (Guo et al. 2008)

$$D = \frac{w^2}{4\tau_D} \tag{29}$$

où w est le rayon de la région d'intérêt bleachée (Figure 42 A).
Généralement la constante de diffusion D se situe dans une gamme comprise entre 10^{-3} et 10 $\mu m^2.s^{-1}$) (Salomé et al. 2006). La molécule marquée par fluorescence est initialement supposée être uniformément répartie dans la membrane. La linéarité entre D et w^2 confirme que la diffusion est normale (brownienne).

II.2.4.1.2 Corrélation spectroscopique de fluorescence (FCS)

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une méthode, utilisée depuis les années 70 (Elson and Magde 1974) (Magde et al. 1974). Toutefois, contrairement à la méthode de FRAP, elle n'a été bien connue et vulgarisée que dans les années 2000 où elle a fait l'objet de nombreuses publications (Kriegsmann et al. 2009) (Ramadurai et al. 2009) (Weiβ et al. 2013) (Simeonov et al. 2013) (Doeven et al. 2005) (Bacia et al. 2004) (Heinemann et al. 2012) (Przybylo et al. 2006) (Petrášek et al. 2010) (Ries and Schwille 2008) (García-Sáez and Schwille 2008), notamment pour l'étude de la diffusion membranaire. Cette méthode repose sur la mesure des fluctuations de fluorescence produites par un petit nombre de molécules entrant et sortant d'un volume d'observation d'une fraction de femto-litre, défini par un faisceau laser focalisé (Figure 42 B). Le temps de diffusion τ_D d'une espèce moléculaire est déduit de la fonction d'auto-corrélation temporelle $\mathrm{G}(\tau)$ (Ramadurai et al. 2009). La fonction d'autocorrélation $\mathrm{G}(\tau)$ décrit les fluctuations de fluorescence du signal à l'intérieur de disque éclairé sur la membrane.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t).\,\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \tag{30}$$

Où $F(t)$ est l'intensité de fluorescence à l'instant t et τ le temps de corrélation.

Dans le cas simple d'une diffusion normale ou brownienne libre, la fonction précédente peut se ré-écrire :

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \quad (31)$$

Où *N* est le nombre moyen de molécules dans la surface d'observation et τ_D est relié à la taille *w* du faisceau laser focalisé et à la constante de diffusion *D* par :

$$\tau_D = \frac{w^2}{4D} \quad (32)$$

La dynamique temporelle du FCS est excellente parce que la fonction d'autocorrélation temporelle est construite pour des τ très faible (de nanoseconde à la minute), et une résolution spatiale limitée par la diffraction optique (environ 200 nm) (Marguet et al. 2006) (Salomé et al. 2006)

Le FCS ne fonctionne pas lorsque la concentration des molécules fluorescentes est supérieure à 1000 marqueurs.μm^{-2}, dans le cas d'une diffusion à 2D (Ries and Schwille 2008), ni lorsque le régime de diffusion est trop lent (Ries and Schwille 2008). D'autre part, le FCS en photon unique peut dans certains cas ne pas suivre la fonction d'autocorrélation, compte tenu du profile non-gaussien du volume d'observation. La mesure du coefficient de diffusion et du temps caractéristique est alors biaisée (Hess and Webb 2002) (Enderlein et al. 2005). Pour pallier à ce souci, le développement du FCS par excitation à deux photons a été nécessaire. Ce dernier permet de détecter avec précision le volume de détection. Cependant, il est nécessaire de tenir compte du photoblanchiment car si le temps de résidence d'une molécule fluorescente est supérieur à son temps de photoblanchiment, les deux temps peuvent être confondus conduisant à des mesures du coefficient de diffusion beaucoup plus rapides qu'attendu. C'est pour cette raison que d'autres variantes ont été développées par Ries et al. (Ries and Schwille 2008) : le « scanning FCS » ou le Z-Scan FCS mesurent des fonctions d'autocorrélation à différentes positions axiales, et permettent de pallier la difficulté de circonscrire verticalement le volume de détection, et d'éviter à la fois les problèmes de photoblanchiment et de fluctuations de membrane ; la spectroscopie STD de super résolution de corrélation de fluorescence (scanning STED-FCS, sSTED-FCS) pour caractériser l'hétérogénéité spatio-temporelle des interactions lipidiques (Honigmann et al. 2014).

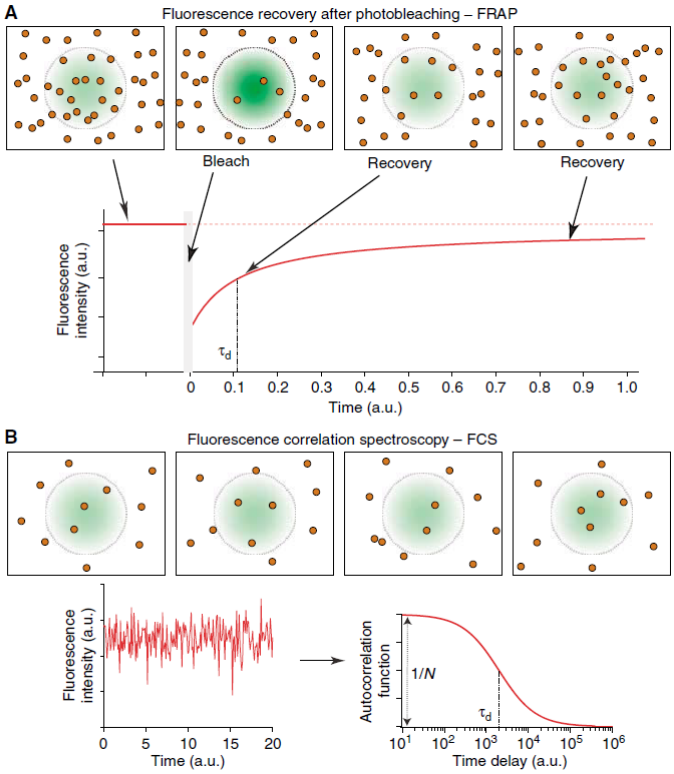


Figure 42 : Principes du FRAP et de la FCS. Ces deux méthodes utilisent un laser pour éclairer une petite région de la membrane (en vert) et collectent la fluorescence de molécules marquées (en rouge) à l'aide d'un montage confocal. D'après (Marguet et al. 2006)

II.2.4.1.3 Le suivi de molécule unique (SPT et SMT)

Le suivi de particule unique (*single particule tracking* ou SPT) ou de molécule unique (*single molecule tracking* ou SMT) est une méthode de microscopie optique qui mesure la position et le déplacement de particules ou de molécules individuelles. Cette technique donne accès à la distribution complète du comportement des particules ou des molécules. Cette technique permet de mesurer les dynamiques spatio-temporelles des particules. Elle a été utilisée depuis en 1982 (Barak and Webb 1982), puis en 1997 (Saxton and Jacobson 1997) et très largement depuis (Owen et al. 2009) (Kusumi et al. 2005) (Ott et al. 2013) (Quemeneur et al. 2014). Elle permet de détecter la position instantanée de molécules puis de reconstruire leur trajectoire. Celles-ci permettent d'extraire les informations physiques sur les propriétés de diffusion de la particule ou les propriétés physiques du milieu environnant. Cette technique a vu le jour grâce aux progrès technologiques de la décennie passée qui ont notamment permis le développement du SPT ou SMT par vidéo microscopie couplée à l'analyse d'images. Dans le cas de suivi de particule unique ou SPT les sondes utilisées sont des particules submicrométriques (particules de latex, nanocristaux (par exemple de quantum dots), ou colloïdes d'or, couplés à la molécule d'intérêt par un anticorps). Dans le cas de suivi de molécule unique ou SMT les sondes utilisées sont des molécules fluorescentes Figure 43-A. La résolution spatiale est de l'ordre du nanomètre et dépend de la sensibilité de la caméra. La résolution temporelle généralement imposée par la cadence vidéo peut atteindre plusieurs centaines de Hz. A partir des trajectoires des particules, on peut calculer le déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps. Ce dernier permet de déterminer les modes de diffusion. A une diffusion rapide et confinée aux temps courts se superpose une diffusion lente aux temps longs Figure 43-B.

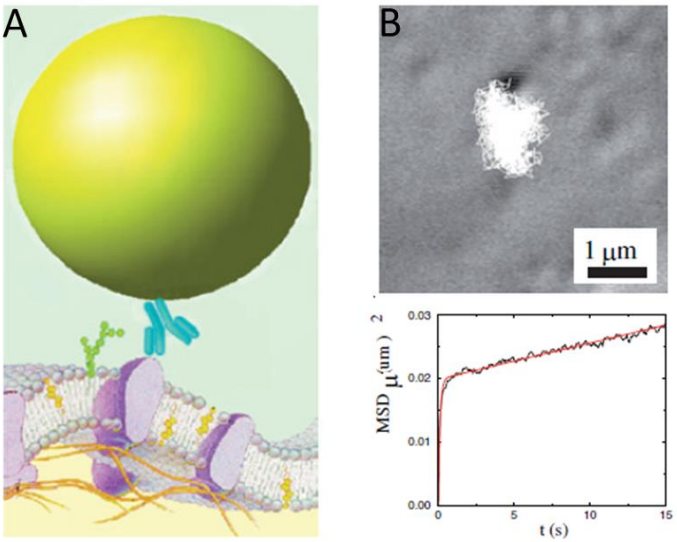


Figure 43 : (A) Le schéma de principe du « suivi de molécule unique ». La particule ou molécule (ici un colloïde d'or) est greffée à la protéine ou au lipide d'intérêt par l'intermédiaire d'un anticorps, en bleu ; (B) en haut, une trajectoire acquise par détection de position en vidéo microscopie (pendant 2 mn), en bas le déplacement quadratique moyen (MSD) de la position en fonction du temps, calculé à partir de cette trajectoire. A une diffusion lente aux temps longs se superpose une diffusion rapide et confinée aux temps courts. D'après (Salomé et al. 2006)

La méthode de SPT peut donner des valeurs du coefficient de diffusion erronées dans plusieurs situations : si la fréquence d'acquisition est mal choisie ou si le rapport signal sur bruit est trop faible, cela entraîne une erreur sur la position de la particule entraînant une sous-diffusion apparente (Owen et al. 2009) (Martin et al. 2002).

Les méthodes de FRAP et FCS réalisent une mesure moyenne, alors que les SPT et SMT suivent des molécules uniques et permettent une caractérisation plus fine des sous-populations (Marguet et al. 2006). C'est pourquoi dans ce travail, j'ai utilisé cette dernière méthode pour suivre les lipides et les protéines dans des GUVs contenant des protéines.

II.2.5 Motivation : Objectif de ma thèse

La diffusion latérale des lipides et des protéines transmembranaires est essentielle pour les fonctions biologiques. Dans le contexte cellulaire, la fraction surfacique des protéines membranaires est élevée, donc la diffusion se fait dans un milieu très encombré. Le but de ma thèse est d'étudier in vitro l'effet de l'encombrement par les protéines sur la diffusion des protéines et des lipides. Jusqu'à présent, les mesures de diffusion latérale ont généralement été réalisées à faible densité de protéines, et l'effet d'encombrement des inclusions membranaires ou des protéines membranaires a été peu étudié expérimentalement, ou à des densités très fortes comme dans le cas de la BR ou de la gramicidine pour lesquelles il n'existe pas de modèle théorique permettant d'interpréter les mesures. Nous avons utilisé une méthode de suivi de particules unique (SPT) pour suivre les trajectoires de la pompe à protons Bactériorhodopsine (BR) et de lipides marqués avec des quantum dots au bas de vésicules unilamellaires géantes en fonction de la fraction de surface totale (Φ) de BR reconstituée dans la membrane constituée par ailleurs de 1,2-Dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC). Nous avons comparé nos résultats aux différents modèles existants dans la littérature.

III Protéines étudiées

III.1 Premiers essais : l'aquaporine 0

L'aquaporine 0 (AQP0) est une protéine transmembranaire permettant un transport efficace de l'eau à travers les membranes de la lentille du cristallin. L'AQP0 a été identifiée pour la première fois dans les cellules du cristallin de bovins et dénommée MIP pour Major Intrinsic Protein (Zampighi et al. 1989) (Gonen et al. 2004). Sa fonction est de transporter des molécules d'eau en présence d'une différence de pression osmotique. Elle présente deux structures différentes en fonction de son emplacement dans le cristallin soit une structure intacte, lorsqu'elle est localisée dans la périphérie du cristallin de l'œil (cortex), soit une structure tronquée résultant d'un clivage protéolytique pendant le processus de maturation du cristallin (Gonen et al. 2004). L'AQP0 présente une forme globalement cylindrique et donc, ne déforme pas les membranes comme cela avait été démontré à partir de mesures de tri dans des nanotubes ou à partir de mesures de diffusion (Aimon et al. 2014) (Quemeneur et al. 2014). Pour cette raison, comme je vais l'expliquer plus loin au § IV.2.4.2, elle semblait une bonne candidate pour étudier l'effet de la concentration de protéines sur la diffusion en s'affranchissant des effets de déformation membranaire. J'ai donc utilisé des AQP0s au début de ma thèse. Les expériences à faible densité de protéines étaient réalisables. Mais pour les fortes concentrations, nous avons observé que l'aspiration par une micropipette induisait une variation de volume des GUVs et les rendait "spongieuses". Cette protéine a donc été abandonnée. Nous avons alors choisi la bactériorhodopsine (BR) qui est également une protéine cylindrique qui ne déforme pas la membrane (J.-B. Manneville et al. 1999) et n'a pas les propriétés "gênantes" d'une porine pour mes expériences.

III.2 La bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine (BR) est une protéine membranaire intégrale exprimée à la surface d'une archéobactérie, Halobacterium salinarium (appelée aussi Halobacterium halobium). Ce microorganisme se développe dans les milieux fortement salins, tels que les marais salants. Il fut découvert tout d'abord dans les archéobactéries halophiles (Stoeckenius and Rowen 1967) (Oesterhelt and Stoeckenius 1971). En conditions anaérobies, cette bactérie synthétise et concentre la BR dans des portions de membrane appelées "membrane pourpre" à cause de leur couleur violette; en effet, cette protéine absorbe la lumière visible avec un spectre large d'absorption et un maximum dans le vert à une longueur d'onde de 568 nm (Figure 45). La BR dans cette membrane pourpre s'organise naturellement en une structure cristalline bidimensionnelle hexagonale. La base de la structure est constituée de trimères de protéines.

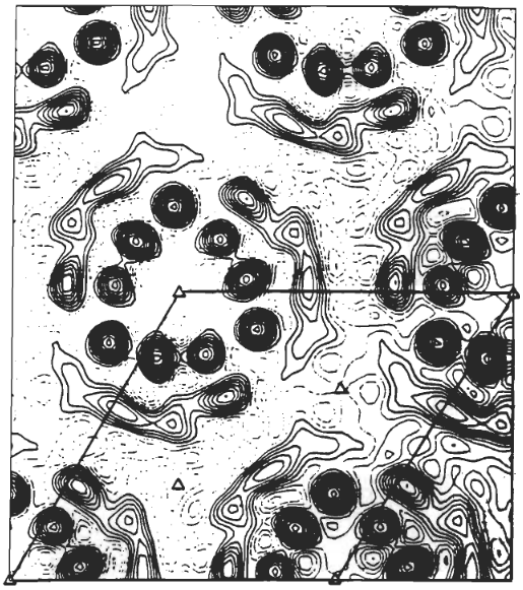


Figure 44 : Carte de densité de diffraction montrant la structure bidimensionnelle cristalline hexagonale de la membrane pourpre avec une résolution de 0.7 nm. Les protéines s'organisent dans un plan avec une symétrie d'ordre trois (petits triangles). Les lignes pleines foncées correspondent aux dimensions de la maille unitaire (6.2 nm x 6.2 nm). On voit un trimère de BR par maille élémentaire du réseau (Unwin and Henderson 1975)

Il a été montré que la BR fonctionne comme une pompe à protons en utilisant l'énergie lumineuse pour produire un gradient de protons à travers la membrane des cellules (Oesterhelt and Stoeckenius 1973). La bactérie, grâce à l'ATP synthétase présente dans la membrane pourpre, utilise ce gradient de protons pour synthétiser de l'ATP directement fonctionnel pour la cellule. D'autre part, la BR est organisée en 7 hélices alpha transmembranaires emprisonnant une molécule de rétinal (Ehrenberg and Meiri 1983) (Cf. § suivant). Des rhodopsines apparentées à la BR ont été identifiées dans les eubactéries (Béja et al. 2000) et les eucaryotes unicellulaires (Bieszke et al. 1999).

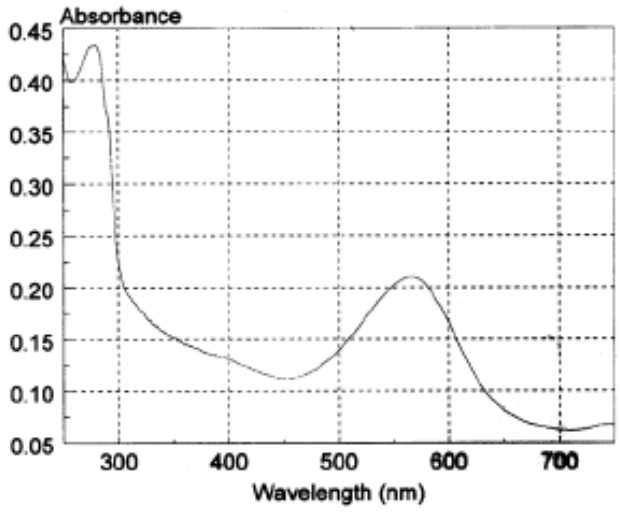


Figure 45 : Spectre d'absorption de la BR. Cette image a été prise dans la thèse de Jean-Baptiste Manneville (Jean-Baptiste Manneville 1999).

III.2.1 Structure de la BR

La BR est une protéine membranaire intégrale, de poids moléculaire M_{BR}=26 kDa. Sa structure secondaire comporte une séquence de 248 acides aminés arrangés en 7 hélices alpha trans-membranaires numérotées de A à G (Figure 46), reliées par de courts segments extra-membranaires.

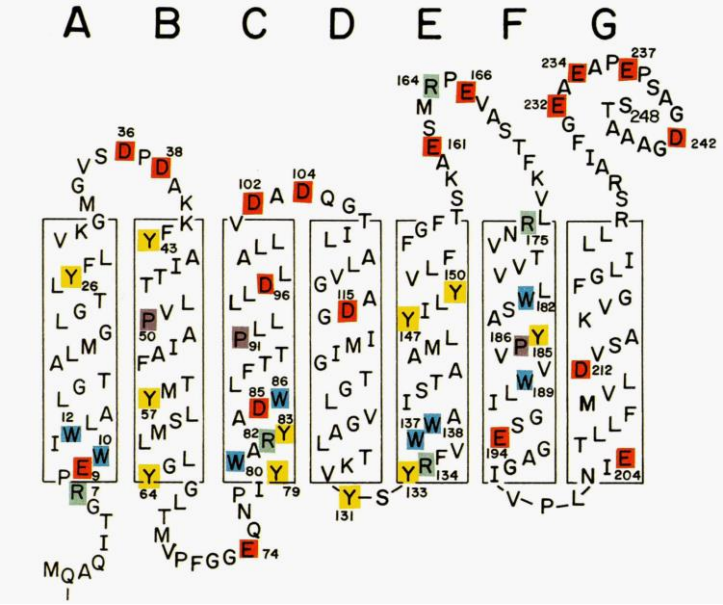


Figure 46 : Structure secondaire de la BR (le rétinal n'est pas montré). Les différents acides aminés sur fond en couleur et numérotés sont ceux qui ont un rôle particulier et ont donné lieu à une mutation génétique. Les lettres A à G sont les 7 hélices alpha. Le coté cytoplasmique de la protéine est situé vers le dessus de la figure et l'extérieur de la cellule vers le dessous. (d'après (Khorana 1988))

La BR forme naturellement des cristaux dans la membrane pourpre (Blaurock 1975) (Richard Henderson and Unwin 1975). Cela a permis d'obtenir relativement tôt une structure de cette protéine. Elle forme aussi très facilement des cristaux quand elle est purifiée et reconstituée à suffisamment forte densité (Michel and Oesterhelt 1980). Sa reconstitution dans des phases cubiques a aussi permis d'améliorer la résolution de sa structure (Pebay-Peyroula et al. 1997). Pour cette raison, elle est la première protéine membranaire dont on a pu déterminer la structure de tous les intermédiaires conformationnels (Luecke et al. 1999) (Kühlbrandt 2000). Au cours des années et de l'amélioration de la résolution des techniques structurales, diffraction des rayon X et microscopie électronique (Richard Henderson and Unwin 1975) (R. Henderson et al. 1990) (Kimura et al. 1997) (Essen et al. 1998) (Luecke et al. 1998) (Belrhali et al. 1999) (Subramaniam 1999), un consensus sur la structure tridimensionnelle détaillée de la BR s'est dégagé. Sur la Figure 47 on peut voir la position du rétinal en rose, dont la fonction sera discutée après, au milieu des 7 hélices alpha en orange. Plus récemment, la technique d'AFM à haute vitesse a permis de suivre directement les changements conformationnels de la protéine (Shibata et al. 2010). Enfin, avec le laser à Rayons X, 13 intermédiaires structuraux succsessifs qui apparaissent juste après l'activation ont pu être déterminés (Nango et al. 2016).

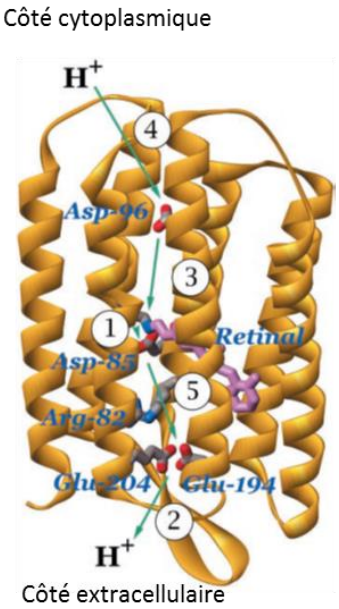


Figure 47 : Structure tridimensionnelle de la BR. Les 7 hélices alpha sont représentées en orange et le rétinal en rose au centre. Les flèches représentent les étapes de translocation de proton (Luecke et al. 1999)

La BR dans son milieu naturel interagit avec les lipides de la membrane. Ainsi dans la membrane pourpre, 1 BR interagit avec 10 lipides natifs au sein de la membrane. Seuls les segments extra-membranaires dépassent de la bicouche.
A partir de la structure de la protéine, on peut calculer les dimensions globales de la protéine. On peut considérer qu'elle a une forme cylindrique avec une surface de base S_{BR} = 8.75 nm^2 (R. Henderson et al. 1990) soit un rayon de R_{BR} = 1.7 nm et une hauteur h ≈ 5.5 nm (Protein Data Bank). La densité de charge de la BR est de deux charges négatives pour une molécule de BR à pH = 7 (Ebrey 1993).

III.2.2 Fonction de la BR

La bactériorhodopsine contient un chromophore, le rétinal qui est lié de manière covalente au reste de la protéine par le résidu lysine 216 (Lys216) dans l'hélice G via une base de Schiff qui peut être protonée ou déprotonée suivant la conformation de la molécule. Le rétinal de la BR présente deux isomères (Figure 48) : le all-trans qui est photoactif avec un maximum d'absorption à 568 nm et le 13-cis qui est passif et possède un maximum d'absorption pour une longueur d'onde de 548 nm (Kouyama et al. 1985).

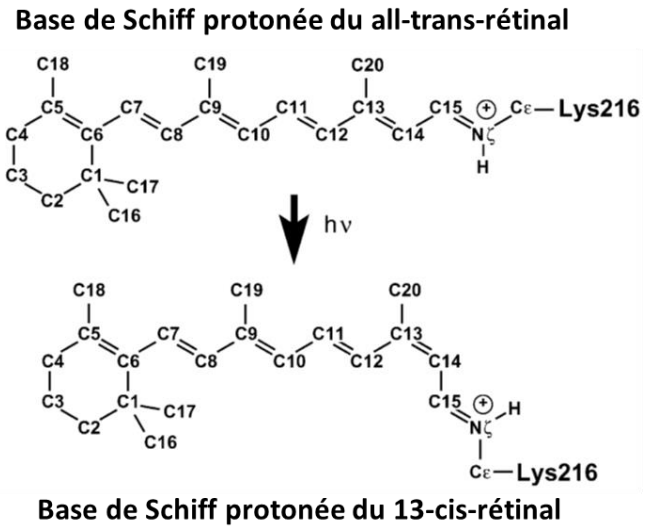


Figure 48 : Formule de deux isomères all-trans et 13-cis du rétinal (d'après (Neutze et al. 2002))

En l'absence de lumière ("dark-adapted"), les deux isomères co-existent de façon équimolaire. Par contre, lorsque la BR absorbe un photon autour de 568 nm, l'isomère 13-cis se transforme en isomère all-trans (Kouyama et al. 1985) (Figure 48). La BR entre alors dans un cycle photochimique conduisant à la translocation d'un proton vers l'extérieur de la cellule (Figure 49 A) (R. Henderson et al. 1990)). Le photo-cycle de la BR fait intervenir plusieurs transitions spectrales ou états K , L, M, N, O avec différentes durées de vie (voir le schéma plus détaillé montrant les intermédiaires spectraux, leurs maxima d'absorption et leurs durées de vie (Figure 49-B). L'ensemble du cycle et donc le transfert d'un proton dure environ 15 ms.

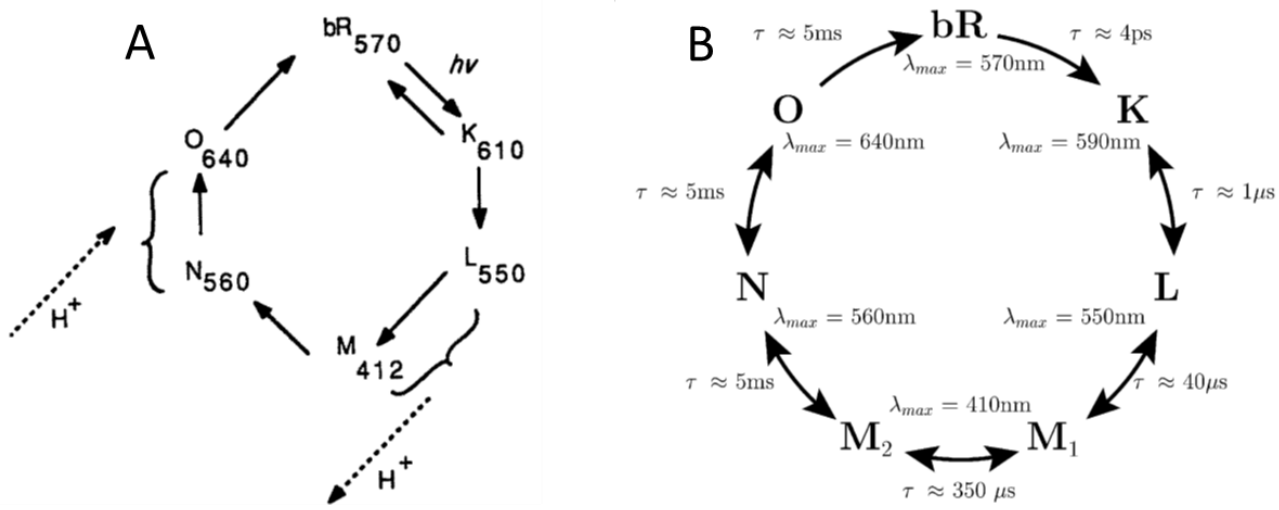


Figure 49 : Représentation du cycle photochimique de la BR. A- Modèle proposé par Losier et al. (1975) (d'après (R. Henderson et al. 1990)). Le cycle est amorcé par l'absorption de la lumière par BR_{570}. Un proton est éjecté à l'extérieur de la cellule et un autre entre dans le cytoplasme aux étapes indiquées en pointillées. B-Modèle récent plus détaillé du cycle photochimique de la BR montrant les intermédiaires spectraux, leur maximum d'absorption, et leurs durées de vie à température ambiante (Neutze et al. 2002)

Dans les années 1999 et 2000, les détails sur les mouvements moléculaires et les mécanismes sous-jascents lors de la translocation d'un proton à l'extérieur de la cellule ont vu le jour (Luecke et al. 1999) (Kühlbrandt 2000) (Neutze et al. 2002) (Nango et al. 2016). La Figure 50 représente les différents changements de conformation de la protéine durant un cycle complet,

correspondant aux étapes de transfert du proton à travers la protéine (étapes 1,2,3,4,5 et a,b,c,d sur la Figure 50). On peut voir à droite en 3D à l'état fondamental (Figure 50 A) les 7 hélices alpha transmembranaires de la BR reliées entre elles par une boucle de chaque côté de la membrane cellulaire et l'extrémité N-terminale du rétinal liée à la BR dans l'hélice G. Comme je l'ai mentionné plus haut, lorsque la BR est excitée le rétinal passe de la forme all-trans protoné à la forme 13-cis protoné à environ 4 picosecondes à l'état K et 1 microseconde à l'état L (Edman et al. 1999). Dans l'état L sur la (Figure 50 a) une des extrémité du rétinal tordu autour de la double liaison le rapproche du résidu Aspartate 85 (Asp85) chargé négativement dans l'hélice C (voir Figure 50 b). En conséquence, le proton situé sur l'extrémité N-terminale du rétinal se trouve dans une situation énergétiquement défavorable et se déplace vers l'Asp 85 (étape 1 sur la Figure 50) via la tyrosine 89 (Subramaniam and Henderson 2000) ou l'Asp 212 et d'une molécule d'eau étroitement liée pour former l'intermédiaire L. Il est important de noter que l'hélice C se tord pour favoriser le transfert efficace du proton en rapprochant l'Asp85 de l'extrémité N-terminale du rétinal (voir Figure 50 B).

Quand le rétinal se déprotone, il passe du rose au jaune et l'atome d'azote se déplace de 0.07 à 0.1 nm vers le côté cytoplasmique (Luecke et al. 1999) (Subramaniam and Henderson 2000) poussant sur l'hélice F qui se déplace de sa position initiale de sorte que sa partie supérieure se déplace d'environ 0.35 nm à la fin de l'état M (Luecke et al. 1999). Dans le même temps l'hélice G occupe sa place (Subramaniam and Henderson 2000) (Vonck 2000) comme l'indiquent les sens des flèches bleues sur la Figure 50 C.

De l'état M à N, le rétinal se reprotone à partir de l'Asp 96 (étape 3 la Figure 50) qui à son tour est reprotoné (étape 4 la Figure 50) grâce au mouvement des hélices F et G dans le sens des deux flèches bleues sur la Figure 50 D (Subramaniam and Henderson 2000) (Vonck 2000).

Dans la transition N à O, le proton en attente sur l'Asp 85 est éjecté à l'extérieur de la cellule via les résidu Glu 194 et Glu 204 en passant par Arg82 (voir les étapes 2 et 5 sur la Figure 50) (Nango et al. 2016). La fin de l'Arg 82 chargée positivement se déplace légèrement vers le bas à l'état M pour faciliter la translocation du proton depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. A l'issue de l'éjection du proton, le rétinal reprend sa forme all-trans. De même les hélices F et G retrouvent leur position initiale et un autre cycle transfert de proton peut recommencer et cela se répète infiniment.

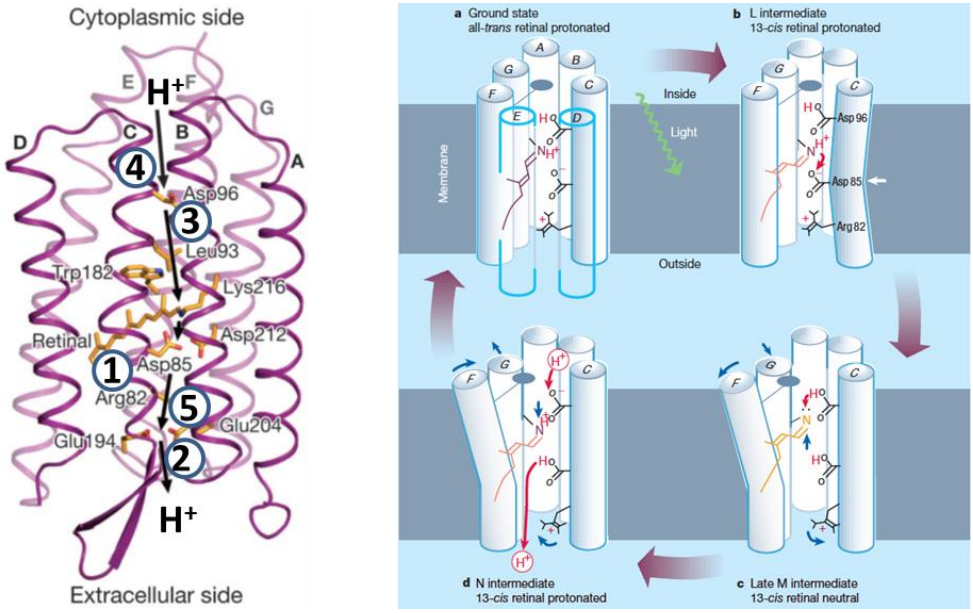


Figure 50 : Représentation schématique des étapes de transfert de protons dans le photocycle de la BR. L'image de gauche montre les 7 hélices alphas A à G. et les résidus stratégiques qui participent au transfert de protons (Asp96, Asp85, Arg82, Glu194, Glu204), ainsi que le rétinal lié à Lys216 dans l'hélice G sont mis en évidence (Nango et al. 2016) (Neutze et al. 2002). L'image de droite également montre les 7 hélices alpha mais cette fois-ci reliées par de courtes boucles à l'état fondamental (a). Quand la BR est excitée, elle change de structure et l'hélice C se déplace pour faciliter le transport de proton. Les résidus qui participent au transfert de protons (Asp96, Asp85, Arg82), ainsi que le rétinal lié à Lys216 dans l'hélice G sont mis en évidence à l'état L (b) (Kühlbrandt 2000). (c) Etat M : Le rétinal déprotoné change de couleur, il passe du rose au jaune et l'atome d'azote à l'intérieur de la cellule. Les hélices F et G aussi se déplacent. (d) Etat N : translocation du proton à l'extérieur de la cellule via les résidus Glu194, Glu204 et des molécules d'eau. Les hélices F et G se déplacent en sens inverse de (c) puis retourne à l'état fondamental (a) et le cycle recommence.

Enfin, il est important de noter que le transfert du proton vers l'extérieur de la cellule dépend du pH, corroborant le rôle important de certains acides aminés impliqués dans la migration du proton (Kono et al. 1993).

IV Matériels et Méthodes

IV.1 Production de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) contenant la Bactériorhodopsine.

La bactériorhodopsine (BR) est une protéine transmembranaire exprimée dans la membrane de la bactérie *Halobacterium Salinarium*. Cette bactérie de petite taille (0.8 µm de diamètre et d'environ 5 µm de longueur) est présente dans les milieux de forte salinité tels que les marais salants (Concentration en NaCl ~ 4M). La BR est présente à très forte densité dans des membranes de la bactérie appelées membranes pourpres à cause de leur forte couleur violette. La BR est l'unique protéine constituant la membrane pourpre. Pour cette raison, elle peut être facilement purifiée par solubilisation de la membrane pourpre par des détergents (§IV.1.2.2). La production de la membrane pourpre a été effectuée par Daniel Levy (laboratoire PhysicoChimie Curie). Nous disposions ainsi d'un stock de membrane pourpre concentrée à 18 mg/mL et stockée à l'abri de la lumière à une température de – 20°C.

IV.1.1 Marquage de la Bactériorhodopsine avec de la Biotine

Dans ce travail, je dois pouvoir répérer précisément la position de la BR au sein de la membrane des GUVs. Il est donc nécessaire de marquer la protéine à l'aide de Biotine permettant ultérieurement un marquage avec des quantum-dots fonctionnalisés avec des streptavidines à leur surface. Cette étape est réalisée avant la solubilisation de la protéine à partir de la membrane pourpre.

Afin de réaliser la fonctionnalisation de la BR avec une biotine, nous utilisons les réactifs EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin qui permettent un marquage simple et efficace en solution des protéines et de toute macromolécule contenant des amines. Les esters de N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) conjugués à la biotine réagissent efficacement avec des groupes amines primaires (-NH2) ou avec les amines N-terminales des protéines pour former des liaisons amides stables (Figure 51).

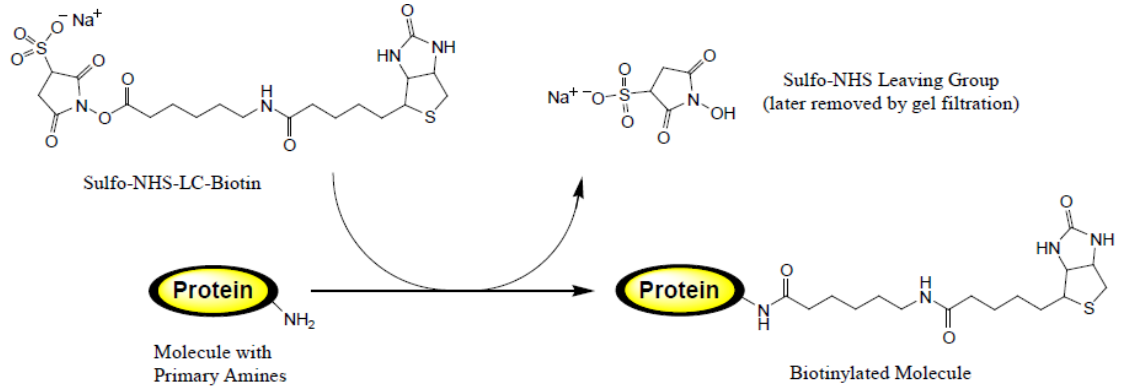


Figure 51: Réaction de la molécule de Sulfo-NHS-LC-Biotin avec une amine primaire (d'après https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21435).

L'efficacité de la fonctionnalisation de la BR par la biotine dépend de la répartition des groupements amine sur la protéine, de la concentration de protéines et de la quantité de réactifs utilisés. Il y a une seule amine sur la BR qui se situe sur son extrémité N-terminale (Cf chapitre 2 Figure 46). Nous avons utilisé 2 µl de réactif à 5.6 $mg.mL^{-1}$ et 30 µl de protéine à 0.42 ± 0.14 $mg.mL^{-1}$. Nous avons donc un large excès de réactif par rapport aux protéines, soit un rapport molaire de 41 (biotine réactive par BR). On a obtenu ainsi une fonctionnalisation de 1 molécule de Biotine par BR. Ensuite l'excès de biotine non liée a été éliminé par centrifugation (rotor TLA-100A), à 60000 g pendant 20 min. Notons qu'à cette étape, la BR est toujours dans la membrane pourpre et donc qu'elle sédimente lors de la centrifugation. La protéine marquée est alors nettoyée trois fois par resuspension du culot dans du tampon PBS composé de 8.0 $g.L^{-1}$ de NaCl , 0.2 $g.L^{-1}$ KCl, 1.44 $g.L^{-1}$ Na_2HPO_4 et de 0.24 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4

IV.1.2 Reconstitution de la BR dans des petits liposomes

IV.1.2.1 **Principe de la méthode**

Différentes méthodes de reconstitution de protéines membranaires dans des vésicules unilamellaires géantes (GUVs) c'est-à-dire de diamètre de l'ordre de la dizaine de microns ou au-delà, ont été développées (pour un protocole voir (Garten et al. 2015) et pour une revue (Jean-Louis Rigaud and Lévy 2003)). L'électroformation à partir de petits protéo-liposomes est une des méthodes de choix qui fournit des vésicules géantes essentiellement unilamellaires. C'est pour cette raison que nous l'avons choisie. La première étape consiste à reconstituer d'abord la BR dans des petits liposomes (Small Unilamellar Vesicles, SUVs) de quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Les différentes étapes conduisant à la reconstitution de la protéine en petits liposomes sont les suivantes (Cf. Figure 52):

1. Solubilisation des protéines au sein des membranes à l'aide de détergent
2. Préparation des SUVs purement lipidiques de DOPC
3. Mélange des protéines en détergent et des SUVs de DOPC
4. Retrait du détergent à l'aide de Biobeads.

Par la suite, j'appellerai **LP le rapport MASSIQUE lipide: protéine**

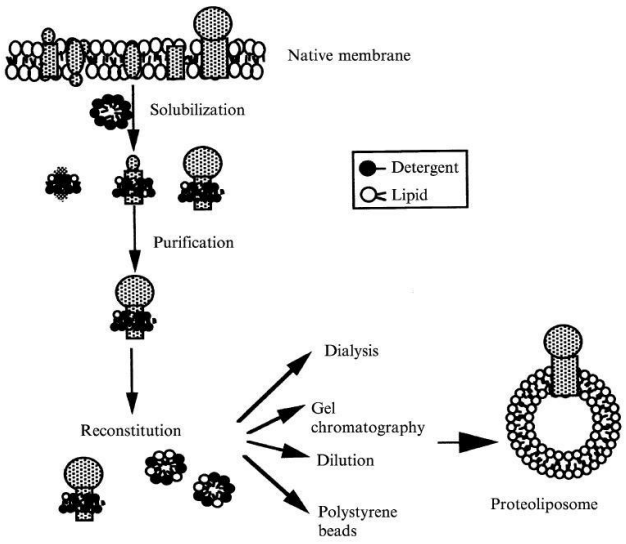


Figure 52 : Représentation schématique des étapes de reconstitution d'une protéine membranaire en petits liposomes. Avec la membrane pourpre, nous n'avons pas à réaliser l'étape de purification puisqu'elle ne contient pas d'autres protéines membranaires que la BR. Ici, nous avons utilisé des Biobeads (polystyrene beads) pour retirer le détergent (d'après (Jean-Louis Rigaud and Lévy 2003)).

IV.1.2.2 **Solubilisation de la BR**

La solubilisation représente la première étape du processus de reconstitution. La solubilisation de la membrane pourpre est effectuée à l'aide d'un détergent non dénaturant (triton X100) avec un rapport en masse BR/détergent (1:5) (en accord avec (Gohon et al. 2008)). Le détergent est laissé à incuber avec la membrane à température ambiante sous agitation magnétique constante pendant 24h. La fraction de membrane non solubilisée est retirée de l'échantillon en effectuant une centrifugation durant 20 min à 60000 g, (rotor TLA-100A). La fraction soluble de l'échantillon est alors prélevée. A cette étape, la solution est essentiellement constituée de BR entourée d'une "couronne" de détergent Triton X-100. Mais elle contient aussi également des lipides initialement présents dans la membrane pourpre (environ 10 lipides par BR (Grigorieff et al. 1996)).

IV.1.2.3 **Reconstitution en liposomes**

Après solubilisation, la bactériorhodopsine est reconstituée dans des petits liposomes (SUVs). Nous avons choisi de reconstituer les protéines dans des liposomes contenant du 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (Avanti Polar Lipids). Il s'agit d'un lipide très abondant dans les membranes cellulaires animales. Il forme des bicouches fluides à température ambiante, d'épaisseur proche de celle de la BR, donc qui permettent une reconstitution aisée. Sa masse molaire est 786 $g.mol^{-1}$. Sa structure est la suivante (Figure 53)

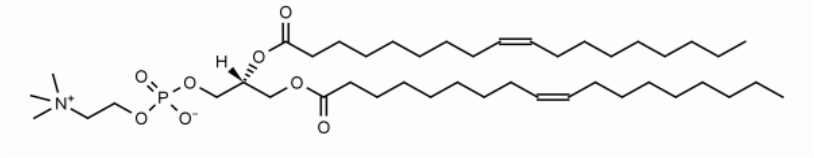


Figure 53 : Structure semi-développée de la molécule de DOPC

IV.1.2.3.1 Préparation des SUVs de DOPC

En général pour ce protocole, les SUVs sont préparées à une concentration lipidique de 10 mg/ml dans un tampon aqueux. Les lipides sont tout d'abord solubilisés à 10 mg/ml dans du chloroforme dans un flacon en verre. On prélève 2 mg (200 µl) de cette solution qu'on transfère dans un petit flacon en verre également. Ensuite, le chloroforme est séché sous un flux d'azote pendant 10 minutes puis dans une enceinte à vide pendant 30 minutes afin qu'il n'en reste aucune trace. Les lipides secs sont réhydratés en ajoutant 500 µl de tampon (10 mM Tris + 150 mM NaCl, pH = 7.5) à température ambiante pendant 30 minutes. Ce tampon peut être adapté selon la nature et la structure des lipides. Après réhydratation, le flacon est agité au vortex pour détacher les liposomes. A ce stade, on doit obtenir une solution opaque; cette diffusion multiple est due à la présence en solution d'une grande quantité de liposomes de taille comparable à celle de la longueur d'onde de la lumière visible. La dernière étape consiste à réduire la taille des liposomes et à les rendre unilamellaires, ce qui est obtenu par sonication dans un bain à ultrasons de type Elmasonic S. La solution doit alors être transparente. On peut alors aliquoter ces SUVs et les conserver à -20°C pendant plusieurs semaines.

IV.1.2.3.2 Mélange des protéines en détergent et des SUVs de DOPC

On mélange la protéine solubilisée dans du détergent non dénaturant (Triton X100) (§ IV.1.2.2) avec les SUVs préparées précédemment à 10 $mg.mL^{-1}$ pour obtenir une solution de protéoliposomes (protéo-SUVs) à une concentration lipidique de 2 $mg.mL^{-1}$ de sorte qu'on ait un rapport molaire lipide:BR égal à 100, soit un rapport massique LP=3, donc une concentration massique nominale de BR C_{BR}=0.66 $mg.mL^{-1}$. Puis, on laisse incuber 2h, à température ambiante et sous agitation constante.
A cette étape, nous sommes donc en présence d'une solution contenant des micelles mixtes de lipides et détergents avec des protéines. Il est alors nécessaire de retirer le détergent présent dans la solution pour former des protéoliposomes.

IV.1.2.3.3 Retrait du détergent par des Biobeads

Cette étape est effectuée en rajoutant des biobeads (*Biobeads* SM2 ; 25-50 mesh, BioRad, Hercule, CA) dans la solution. Les tensioactifs présentent une très forte affinité pour les biobeads SM2 (des particules poreuses de polystyrène) et sont donc préférentiellement absorbés à leur surface. Les biobeads sont donc utilisés pour éliminer les détergents de la préparation (Jean-Louis Rigaud et al. 1995), en particulier le Triton-X100 (Welling et al. 1984). Nous avons donc rajouté 40 mg de biobeads par mg de Triton X-100 présent dans la solution. Le mélange est maintenu sous agitation constante toute la nuit à 4°C.
A l'issue de cette étape, la solution au-dessus des biobeads est prélevée. On obtient alors des protéo-SUVs contenant le lipide choisi (DOPC), la BR, les lipides natifs (environ 10 lipides par BR) et des traces de détergents inférieures à 1% (J.-L. Rigaud et al. 1998). Les protéoliposomes obtenus sont aliquotés et stockés à -80°C.

IV.1.2.4 Mesure de la concentration de Bactériorhodopsine dans nos protéoliposomes de stock

Pour les expériences, nous avons préparé en plus des SUVs de DOPC deux stocks de protéoliposomes à LP=3 (concentration théorique en protéine 0.66 $mg.mL^{-1}$) : le premier stock contient la protéine biotinylée (BR-Biot), et le second stock la protéine non fonctionnalisée (BR-NM). En fait, la concentration théorique de BR calculée au début pour préparer les deux stocks n'est pas forcement égale à la concentration réelle de BR après reconstitution dans les liposomes. En effet, pour déterminer la concentration réelle de BR dans nos deux stocks de protéoliposomes, nous avons utilisé la méthode de Bradford. Pour cela, nous avons réalisé une gamme étalon à partir d'une solution de BSA (bovine serum albumin) pour des concentrations allant de 0 à 1 $mg.mL^{-1}$. Le réactif utilisé est le bleu de coomassie. Son maximum d'absorption (DO) passe de 465 nm lorsqu'il est libre, à 595 nm lorsqu'il est lié aux acides aminés basiques, à savoir arginine, histidine, lysine et aux parties hydrophobes des protéines. Nous avons effectué plusieurs mesures d'absorbance à 595 nm (DO595) de façon à avoir une précision raisonnable pour différentes concentrations de BSA. Ensuite, nous avons tracé la moyenne des DO595 en fonction de la concentration de BSA. Cela nous a permis de déterminer la courbe de référence reliant absorption et concentration. A partir de là, nous avons déterminé la concentration réelle de protéine biotinylée (BR-Biot) et de protéine non fonctionnalisée (BR-NM) respectivement égales à 0.42 ± 0.14 $mg.mL^{-1}$ pour BR-NM et 0.34 ± 0.02 $mg.mL^{-1}$ pour BR-Biot. Nous pouvons donc calculer les valeurs réelles des densités dans les protéoliposomes: LP=4.8 pour BR-NM et LP=5.9 pour BR-Biot correspondant respectivement à 158 lipides par BR pour BR-NM et 195 lipides par BR pour

BR-Biot. Pour réaliser l'electroformation des GUVs nous avons choisi d'utiliser le ratio molaire suivant : 1/100 de BR-Biot 49/100 de BR-NM et 50/100 de SUVs de DOPC.

IV.1.3 Electroformation des vésicules unilamellaires géantes

Jusqu'à présent, il existe deux méthodes d'électroformation (c'est-à dire nécessitant l'application du champ électrique) pour préparer des GUVs: *l'électroformation sur fil de platine* mise au point par (Miglena I. Angelova and Dimitrov 1986) (M. I. Angelova et al. 1992) et une adaptation, *l'électroformation sur lames ITO* (Indium Titane Oxide) par (M. I. Angelova et al. 1992) et (Mathivet et al. 1996). Ces deux méthodes permettent de préparer des vésicules géantes en quelques heures. Elles se basent sur l'hydratation de films de lipides anhydres sous un champ électrique oscillant. Elles conduisent à une population homogène de GUVs unilamellaires avec peu de défauts, parfaitement sphériques, de diamètre compris entre quelques µm et 100 µm. L'électroformation sur lames ITO impose l'utilisation de tampons avec moins de 5 mM de sel et pose donc problème en présence de protéines membranaires. J'ai utilisé l'autre méthode qui permet a priori d'utiliser des concentrations physiologiques de sel. Cette méthode a été largement utilisée pour préparer des GUVs contenant des protéines membranaires comme décrit en détail dans (Aimon 2011) (Garten et al. 2015). Elle est également utilisée pour préparer des GUVs contenant uniquement des lipides comme décrit en détail dans (Méléard et al. 2009).

Pour préparer des GUVs, 1 à 2 µl de gouttelettes de protéo-liposomes (protéo-SUVs) sont déposées goutte à goutte et bien séparées sur des fils de platines préalablement nettoyés avec un mélange chloroforme-acétone-éthanol-eau. Après 30 à 45 minutes de séchage sous vide, la solution de protéo-liposomes est partiellement déshydratée et les SUVs ont fusionné pour former un empilement de membranes. On réalise ensuite l'assemblage de la chambre d'électroformation. Elle est basée sur celle mise au point par Ernesto Ambroggio et Luis Bagatolli (Ambroggio and Bagatolli 2009). Elle est formée d'un bloc de Polytétrafluoroéthylène (PTFE) constitué de trois puits de 10 mm de diamètre et de 5 mm de profondeur, de deux fils de platine de 0.5 mm de diamètre séparés par 3 mm de distance bord à bord. Les fils sont positionnés près du bas de la chambre pour faciliter l'imagerie des GUVs qui se forment à leur surface grâce à un microscope inversé à contraste de phase (voir la Figure 54).

La lamelle de dessous est maintenue en place avec de la graisse à vide. De la pâte de scellement Vitrex (Vitrex Medical A/S) assure l'étanchéité de la chambre et empêche toute fuite au niveau des trous par lesquels passent les fils aux deux extrémités. La chambre est ensuite remplie par le haut d'une solution de sucrose appelée "tampon interne" et constituée de 400 mM de sucrose + 5 mM KCl + 1 mM Tris pH 7.5 d'osmolarité 385 mOsm qui se retrouvera à l'intérieur des GUVs à l'issue de l'électroformation. La chambre est fermée avec une lamelle maintenue par de la graisse à vide. La graisse permet une ouverture facile de la lamelle du dessus afin de prélever les GUVs (voir la Figure 54).



Figure 54 : Chambre d'électroformation des GUVs. La chambre est formée d'un bloc de PTFE avec trois puits traversés par deux fils de platine reliés à un générateur AC par des pinces crocodiles.

La chambre de pousse est ensuite reliée à un générateur basse fréquence. Il avait été montré auparavant que la reconstitution fonctionnelle de la BR en GUVs peut se faire à de basses concentrations en sel (Jean-Baptiste Manneville 1999) (Girard 2004), ce qui facilite la préparation et produit en général des GUVs avec peu de défauts. J'ai donc décidé d'utiliser cette méthode. Aux concentrations salines où j'ai travaillé, j'ai utilisé une tension de 1.1 V pic à pic et une fréquence de 10 Hz pendant 2h à la température ambiante. À mesure que le film de protéo-liposomes gonfle, les membranes individuelles se détachent de l'empilement pour former des vésicules qui fusionnent graduellement entre elles jusqu'à former des vésicules géantes. Le suivi de la pousse des GUVs peut être effectué à travers les fils de platine avec un microscope à contraste de phase. Les observations en microscopie à contraste de phase des différentes étapes de pousse des GUVs sont présentées sur la Figure 55. Les GUVs forment des sortes de "mousse" ou "grappes" au bout de 20 et 30 minutes (Figure 55 A). Au bout de 2h maximum, les GUVs (Figure 55 B) sont prélevées avec précaution avec un capillaire de verre.

Nous avons réalisé la formation des GUVs en faisant varier le rapport massique lipide/protéine (LP) entre 1000 et 5.

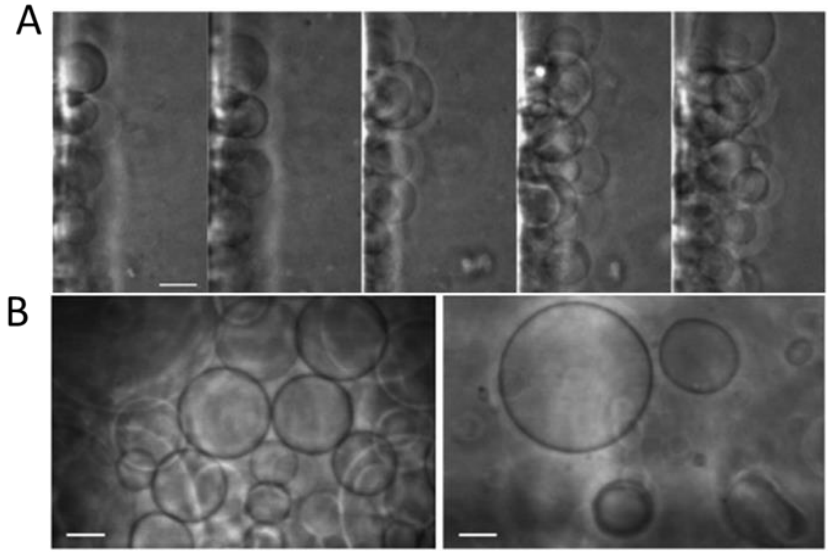


Figure 55 : A- Observation de GUVs pendant l'électroformation sur fil de platines. Les GUVs forment des "grappes" sur les fils, entre 20 et 30 minutes. B. GUVs obtenues entre 1h et 2h, à la fin de l'électroformation (à gauche) et celles obtenues après leur détachement (à droite). Barres d'échelle : 10 µm (adapté de (Méléard et al. 2009))

Elles peuvent être conservées à 4°C dans un eppendorf pendant 2 jours au plus. Le principe de la méthode d'électroformation est résumé sur la Figure 56.

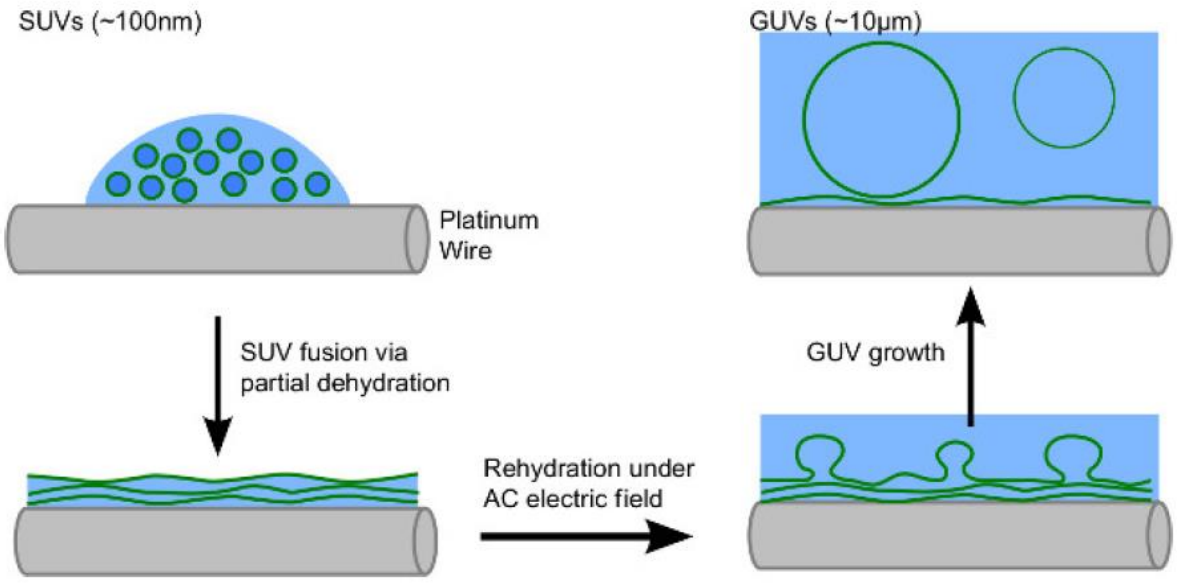


Figure 56 : Schéma de l'électroformation des GUVs : Des gouttelettes contenant des protéo-SUVs sont déposées sur des fils de platine. La déshydratation partielle de la solution induit un empilement de membranes. Le tampon de réhydratation est ensuite ajouté et un champ électrique AC est appliqué. À mesure que le film gonfle, les membranes individuelles se détachent de l'empilement pour former des GUVs (d'après (Aimon 2011) et (Garten et al. 2015).

IV.2 Montage expérimental

IV.2.1 Microscope optique

Le schéma général du montage expérimental est représenté sur la Figure 57. Nous utilisons un microscope à épifluorescence inversé (Eclipse Ti, Nikon France SAS). Il est équipé d'un objectif à immersion à huile x100 Nikon Plan Fluor (N.A=1.3), et de cubes de filtres interchangeables adaptés aux marqueurs fluorescents utilisés. Le faisceau lumineux émis par une lampe à vapeur de mercure HBO, est filtré à travers un filtre d'excitation à bande étroite correspondant à une longueur d'onde d'excitation λ_{exc} et est réfléchi vers l'objectif par un miroir dichroïque. Le miroir dichroïque réfléchit les longueurs d'onde inférieures à une longueur d'onde de coupure λ_c, mais transmet les longueurs d'onde supérieures à λ_c (pratiquement $\lambda_{exc} < \lambda_c < \lambda_{em}$). Le miroir dichroïque sépare donc le faisceau d'excitation de celui d'émission, ce qui permet de ne détecter que la lumière émise par l'échantillon. La fluorescence issue de l'échantillon passe directement à travers le miroir dichroïque. Il est ensuite filtré par un second filtre (filtre d'émission) avec une bande passante centrée sur λ_{em} et est ensuite réfléchi pour atteindre les oculaires et/ou la caméra. L'ensemble des filtres de fluorescence que j'ai utilisés pour observer les quantum dots (QDs) étaient les suivants : un filtre excitateur BP435/40, un miroir dichroïque λ_c=510 nm et un filtre d'émission BP655/15 (Quemeneur et al. 2014).

Le microscope à épifluorescence est couplé à une caméra EMCCD très sensible et à faible niveau de bruit (iXon DU-897; Andor Technology). Cette caméra est reliée à un ordinateur, ce qui permet une acquisition des images dans la région d'intérêt (ROI). Cette caméra est capable d'effectuer des images jusqu'à une fréquence de 300 images par seconde. Une autre caméra reliée à un écran permet de visualiser l'expérience en direct en lumière blanche.

Ce microscope est également équipé de deux systèmes de micropipettes permettant l'aspiration des vésicules d'un côté, et l'injection des Qdots de l'autre. Les supports de micropipettes sont montés sur des micromanipulateurs (Narishige, Japan) eux-mêmes fixés sur la platine du microscope. Les deux pipettes sont reliées à un réservoir d'eau mobile en hauteur. Le réservoir peut être déplacé verticalement soit manuellement (pipette d'injection) soit à l'aide d'un moteur moteur (Zaber technology, Canada). La variation de hauteur d'eau du réservoir permet de créer une différence de pression hydrostatique entre l'intérieur et l'extérieur de la micropipette et permet donc de contrôler la tension membranaire. Cette dernière est calculée à l'aide de la loi de Laplace, comme détaillé dans le paragraphe IV.2.2.3. La micropipette d'aspiration permet de contrôler la tension membranaire et de maintenir la GUV en place.

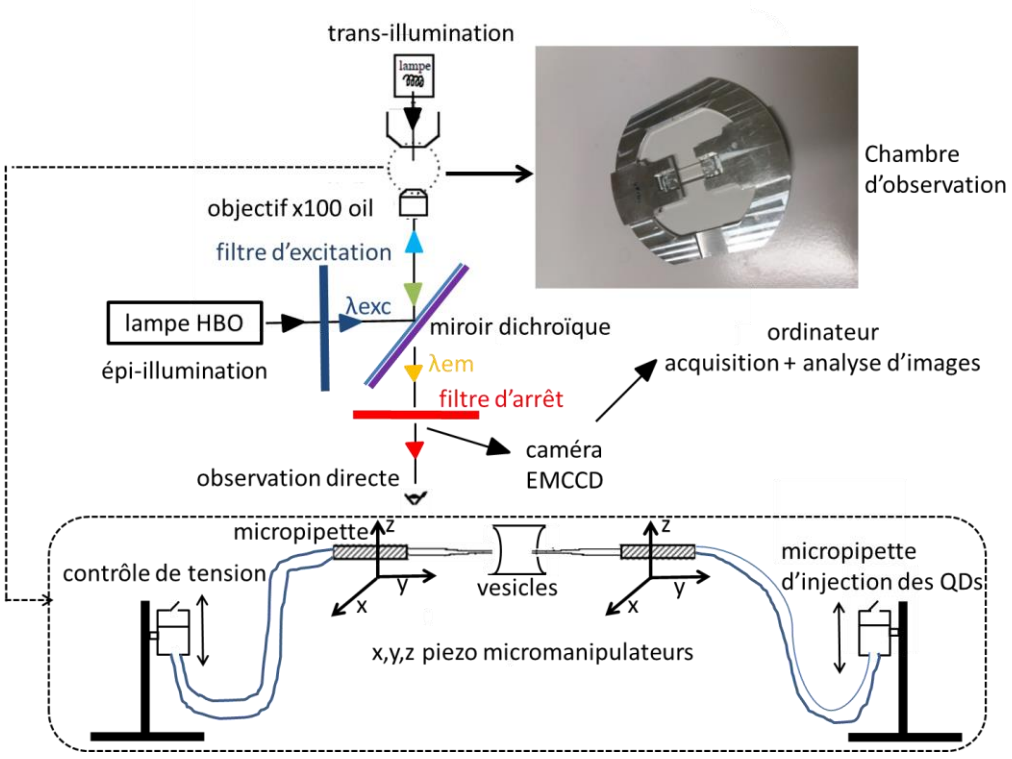


Figure 57 : Schéma du montage expérimental sur le microscope. L'observation du mouvement des protéines est réalisée en épifluorescence à l'aide d'une caméra ultrasensible EMCCD. Le système d'aspiration par une micropipette montée sur un micromanipulateur permet de contrôler la tension. La seconde micropipette permet l'injection des QDs dans la chambre.

IV.2.2 Chambre d'observation

La chambre d'observation est construite en assemblant deux lamelles de tailles différentes (30x11mm pour la lamelle de dessous et 9x35mm pour la lamelle de dessus, voir sur la Figure 57) avec de la graisse à vide (Corning) sur un support métallique prévu à cet effet. L'épaisseur de la chambre est égale à 175µm. Deux cotés de la chambre d'observation sont laissés ouverts

pour permettre dans un premier temps le transfert des GUVs et dans un second temps le passage des deux micropipettes. Ensuite, la chambre est placée sur la platine du microscope. Puis elle est passivée avec de la β-caséine (5 $g.L^{-1}$) pendant 1h au plus pour limiter l'adhésion des GUVs au verre. Des GUVs contenant des protéines ou non, préparées précédemment dans du sucrose d'osmolarité 385 mOsm sont transférées dans la chambre d'observation contenant une solution de même osmolarité composée de 40 mM KCl ; 20 mM Tris pH=7.5; 50 mM NaCl et 205 mM Glucose. L'osmolarité des solutions est vérifiée au préalable avec un osmomètre à pression de vapeur (Vapor pressure osmometer model 5600, Wescor) ou avec un micro-osmomètre automatique à point de congélation (Micro-Osmomètre type 15, Löser).
La densité du sucrose présent à l'intérieur des vésicules étant supérieure à celle du glucose à l'extérieur, les GUVs vont sédimenter naturellement au fond de la chambre sous l'action de leur propre poids.

IV.2.2.1 **Fabrication des micropipettes**

Le système d'aspiration par micropipette a été développé par E. Evans, à l'origine pour l'étude des propriétés mécaniques des globules rouges (E. As Evans et al. 1976) (Evan A. Evans 1989), puis pour celles des GUVs (Kwok and Evans 1981). Pour la préparation des micropipettes, nous utilisons une étireuse (P-2000, Sutter Instruments Co.) qui permet de chauffer un capillaire en verre (borosilicate GC100-15, Harvard Apparatus No. 30-0017), de 1 mm de diamètre extérieur et de 0.58 mm de diamètre intérieur, par un faisceau laser en étirant chacune des extrémités. Ensuite, nous coupons l'extrémité fine de ces pipettes qui, suite à l'étirage, est fermée ou très inférieure au micromètre. Enfin une micro-forge est utilisée pour contrôler le diamètre voulu des micropipettes. Les micropipettes que nous utilisons ont des diamètres compris entre 5 et 13 µm correspondant au tiers de la taille des GUVs que nous avons utilisées (diamètre entre 15 et 40 µm), permettant ainsi de pouvoir bien les maintenir en place et de contrôler leur tension. Une seconde micropipette de 10 µm est utilisée pour injecter les nanoparticules fluorescentes (quantum dots, QDs) (Cf. paragraphe suivant) et permettre ainsi le marquage des BR insérées dans la membrane des GUVs.

IV.2.2.2 **Marquage de quelques BRs par des nanoparticules fluorescentes (QDs)**

Les expériences réalisées durant ma thèse ont nécessité de détecter les positions instantanées des inclusions membranaires (lipides ou protéines) grâce à une caméra ultrasensible couplée à l'épi-fluorescence comme décrit plus haut. Pour cela, les protéines et les lipides ont été marqués avec des nanoparticules fluorescentes, des quantum dots (QDs) [QD655 fonctionnalisés avec de la streptavidine, initialement à 1µM (Life technology, USA)]. Il est conseillé de les conserver entre 2 et 8°C.

Les quantums dots sont des nanocristaux inorganiques fluorescents (Rasmussen et al. 2013) de très petite taille et avec un rendement quantique exceptionnel. Ils sont actuellement constitués d'un noyau de très petite taille (1 à 10 nm) composé de mélanges binaires de matériaux semi-conducteurs (ZnS, CdS, CdSe, InP, CdTe, PbS, PbTe) qui déterminent leur couleur, et d'une fine enveloppe également semi-conductrice qui augmente leur luminosité (Cf. Figure 58-A) (Rasmussen et al. 2013). Ils sont naturellement hydrophobes et doivent être fonctionnalisés pour la plupart de leurs utilisations en biologie ou biophysique. Pour les rendre biofonctionnels, on les recouvre de polymère amphiphile qui les rend stables et solubles dans l'eau et les tampons. Ce processus de biofonctionnalisation augmente la taille

des QDs. Cela est précisément lié à la nature du polymère utilisé pour rendre les QDs biocompatibles. Elle peut donc varier de 10 à 30 nm de diamètre (Pinaud et al. 2010).

On peut par exemple les recouvrir de biomolécules telles que la streptavidine, une protéine purifiée à partir de la bactérie Streptomyces avidinii et ayant une très grande affinité pour la biotine. En effet, le couple streptavidine-biotine est celui qui possède la plus grande affinité avec une constante de dissociation très faible de l'ordre de $4x10^{-14}$ M (Holmberg et al. 2005). La force de rupture d'une liaison streptavidine-biotine dépend du taux de charge appliqué, variant entre 5 pN et 170 pN pour des taux de charge de quelques 10^{-2} à 10^{5} $pN.s^{-1}$ (Merkel et al. 1999). La liaison entre les QDs recouverts de streptavidine et les lipides biotinylés est donc très stable.

Les QDs ont un spectre d'émission étroit (qui dépend de leur composition) sur toute la plage de longueur d'onde du visible (Figure 58 A) (Dubertret et al. 2002), ce qui en fait des fluorophores uniques. Ils sont plus brillants que les fluorophores organiques, en particulier l'Alexa 488 (Wu et al. 2003). Ils sont aussi photostables et peuvent émettre très longtemps sans photoblanchiment irréversible, au contraire des fluorophores organiques. Ils sont donc des marqueurs fluorescents de choix pour le suivi de particules uniques *in vivo* et *in vitro*. Néanmoins, ils clignotent de façon aléatoire ("blinking") (Figure 58 C) (Nirmal et al. 1996). Sur la Figure 58 C, on a un exemple de clignotement: à t= 0s, le QD est visible et l'intensité d'émission est maximale. Il disparait à t=3s et l'intensité devient nulle, avant de réapparaitre 7 à 12s plus tard.

Au vu du rapport de taille entre les QDs et les inclusions membranaires, on peut se demander si les QDs ne perturbent pas la dynamique des objets étudiés. Il a été montré que, dans des conditions optimales, les QDs et aussi les billes de latex de 40 nm ont une influence négligeable sur la diffusion des lipides, alors que le coefficient de diffusion des colloïdes d'or et des particules de latex de 200 nm sont systématiquement réduits de 2 à 3 fois par rapport à valeur de référence obtenue par FRAP (Mascalchi et al. 2012).

Nous avons choisi dans mon projet d'utiliser des QD655, de tailles comprises entre 10 à 15 nm (Figure 58 B), fonctionnalisés avec de la streptavidine (environ 5 à 10 streptavidines par QD), qui satisfont aux propriétés énumérées précédemment notamment la biocompatibilité, le spectre d'émission et l'absence de perturbation de la dynamique des inclusions. Ils peuvent se lier à des lipides ou des protéines fonctionnalisées par de la biotine. Ainsi, pour mesurer la diffusion des lipides et des protéines, on suit les déplacements individuels des QD655.

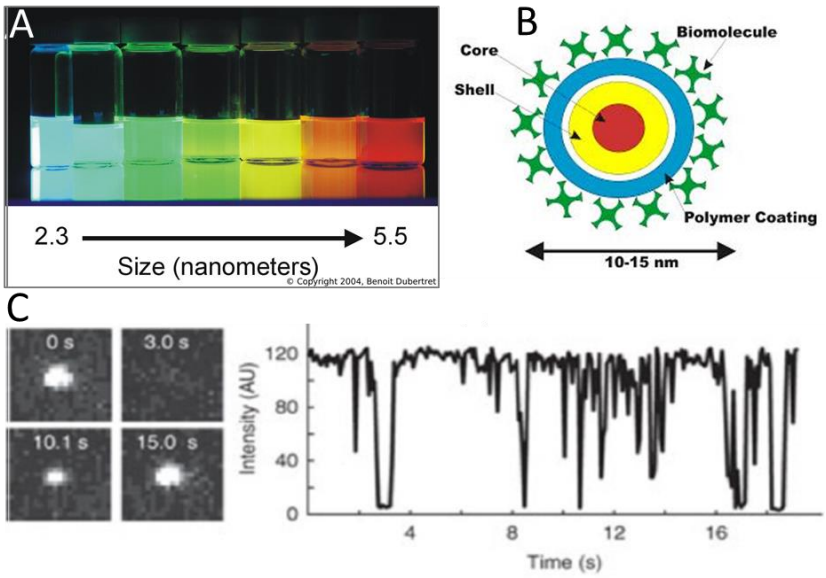


Figure 58 : Propriétés des quantums dots. (A) Fluorescence sur toutes les longueurs d'ondes du visible (Dubertret 2004, qdots.com). (B) Particule fluorescente (QD655) conjugué à la streptavidine (d'après le protocole de biotek, www.biotek.com). (C) Clignotement d'un QD (Nirmal et al. 1996) .

Au début de ce travail, il existait déjà au laboratoire une méthode dite "de centrifugation" qui permettait de marquer, en moins de 3 minutes, une petite fraction des protéo-GUVs avec les QD655 couverts de streptavidine (Quemeneur et al. 2014). Pour cela, on rajoute une petite quantité de QDs (approximativement 1ul de QDs à 0.025 µM) dans un eppendorf contenant une suspension de 100 µl de protéo-GUVs dans 950 µl de glucose. Puis on homogénéise et on laisse incuber pendant 1 à 2 minutes. On fait 2 à 4 cycles de centrifugation avec la micro centrifugeuse de paillasse (45 s, 1000 rpm) où on prélève à chaque fois 900 µl du surnageant qu'on remplace par « le buffer glucose ». Les expériences avaient été réalisées auparavant au laboratoire avec des GUVs contenant une très faible fraction de protéines membranaires. Dans mon cas, j'ai observé qu'avec une densité plus forte, les protéo-GUVs étaient fragilisées lors de la centrifugation et la plupart avaient tendance à se casser. Les GUVs qui résistent sont en général peu nombreuses et de tailles relativement petites (5 à 9 µm), donc pas appropriées pour nos expériences (Figure 73 A). Pour pallier à ce problème, j'ai mis au mis au point une méthode plus efficace qui consiste à injecter très localement les QDs avec une micropipette, ce qui nous permet d'obtenir des GUVs assez grandes pour réaliser les expériences de suivi de particules uniques (Figure 73 B). Dans les conditions utilisées une très petite quantité des BR-Biot (1QD par μm^2 environ) sont marquées par un QD.
Dans cette configuration, deux micropipettes sont nécessaires : la première sert à maintenir et manipuler les GUVs, la deuxième permet l'injection des QDs.

IV.2.2.3 **Tension latérale de la membrane :**

La micropipette qui permet de manipuler la GUV a deux rôles. Elle permet non seulement de maintenir la GUV en hauteur pour éviter le contact avec le fond de la chambre, mais elle permet également de contrôler la tension membranaire de cette dernière. La tension latérale σ (en $N.m^{-1}$) est un paramètre mécanique important des membranes et que j'ai introduit auparavant (Cf. § II.2.1.7.3)

Pour le contrôle de la tension membranaire, on crée une différence de pression entre l'intérieur (P_{int}) et l'extérieur de la micropipette (P_{ext}) grâce à la pression hydrostatique.

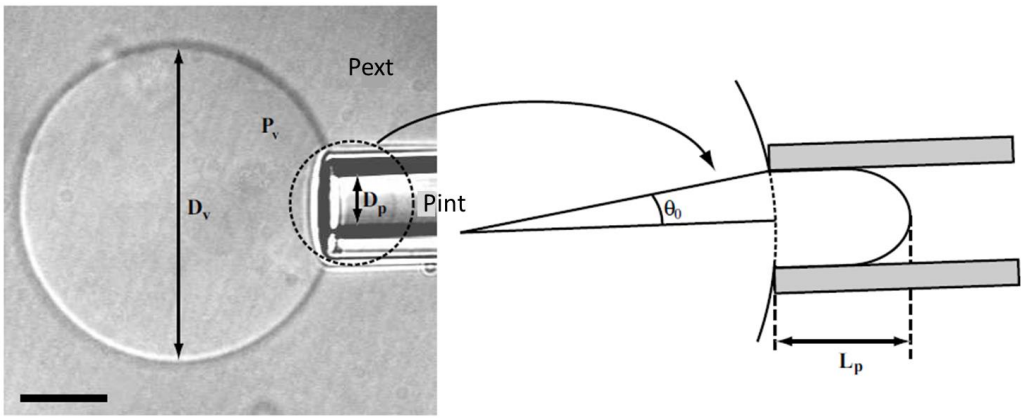


Figure 59 : Image en microscopie DIC d'une GUV de diamètre D_v et de pression P_v aspirée par une micropipette de diamètre D_p et de pression P_{int}. Le contour apparent de la langue de longueur L_p est représenté à droite. La barre correspond à 5µm. Cette image a été prise dans la thèse de P. Girard (Girard 2004).

Pour cela, un réservoir d'eau mobile est relié à la micropipette. La tension latérale se mesure grâce à la loi de Laplace :

$$\Delta P = P_{ext} - P_{int} = 2\frac{\sigma}{R} \quad (33)$$

où R est le rayon de l'interface (rayon de la pipette R_p ou celui de la GUV R_v) et σ la tension, et on obtient:

$$\sigma = \frac{R_P}{2(1 - R_P/R_v)} \Delta P \quad (34)$$

(E. Evans and Rawicz 1990). En pratique, on peut faire varier la tension entre environ 10^{-7}N.m^{-1} à quelques 10^{-3}N.m^{-1}. Au-delà, la membrane se rompt (Olbrich et al. 2000).

Dans mes expériences, je veux uniquement étudier l'effet de la concentration des protéines sur la dynamique des lipides et des protéines. J'ai donc travaillé à des tension relativement fortes (10^{-4}N.m^{-1}) pour limiter les effets liés aux déformations membranaires et aux fluctuations des GUVs.

IV.2.3 Expériences de suivi de particules uniques (SPT)

Le suivi de particule unique (Single Particule Tracking ou SPT) est une technique permettant de quantifier le mouvement de particules individuelles. Ces particules peuvent être soit fluorescentes comme les QDs, soit des nanoparticules d'or ou de Latex par exemple (Mascalchi et al. 2012). Lorsque le suivi des particules est réalisé avec une haute résolution spatiale et temporelle, on peut reconstituer avec précision les trajectoires des inclusions (ici les lipides ou les protéines) auxquelles elles sont liées, à partir de la succession de positions instantanées qui auront été enregistrées. L'analyse de ces trajectoires nous renseignera sur les propriétés de diffusion des particules considérées. Différentes mesures peuvent être effectuées telles que celle du **déplacement quadratique moyen** (en anglais Mean Square Displacement (**MSD**)), ou de la distribution de pas des particules. Dans cette partie, je vais détailler l'obtention de mes données expérimentales, leur analyse ainsi que le calcul du coefficient de diffusion à partir des MSDs.

Le MSD est une moyenne des carrés des déplacements d'une particule ($\langle \Delta r^2 \rangle$). Dans un processus diffusif, le MSD est proportionnelle au coefficient de diffusion de la particule. En pratique, on peut calculer le MSD à partir de la mesure de la position instantanée des points d'une trajectoire. Le MSD est donnée par l'expression suivante (Barak and Webb 1982), pour un processus à 2D:

$$\langle \Delta r^2(\, n.\delta t) \rangle \;=\; \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + \; (y_{i+n} - y_i)^2 \,] \;=\; 4Dt \qquad (35)$$

Où x_i et y_i sont les coordonnées du point i de la trajectoire, N est le nombre total de points, δt est l'intervalle de temps entre deux séquences d'images consécutives (ce qui correspond à l'inverse de la fréquence d'acquisition de la caméra par exemple) et t= $n.\delta t$ est l'intervalle de temps total sur lequel le MSD a été effectuée (Quemeneur et al. 2014)).

Il existe différents types de diffusion des particules : soit une diffusion normale (ou Brownienne) soit une diffusion anormale. Dans ce dernier cas, la diffusion peut être soit sub-diffusive soit hyper-diffusive (Figure 60). Dans le cas de diffusion anormale, la formule (35) n'est plus valide. Elle peut alors être ré-écrite sous la forme:

$$\text{MSD} = 4Dt^{\alpha} \qquad (36)$$

(Havlin and Ben-Avraham 2002) (Dix and Verkman 2008) où α dépend de la nature du mouvement des particules.
Pour α <1, les particules sont sub-diffusives, pour α > 1, la diffusion est super-diffusive.
.

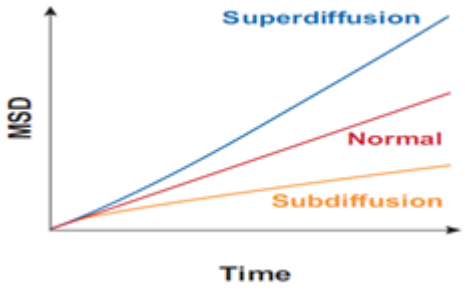


Figure 60: Différents modes de diffusion des particules à temps court, correspondant à différentes valeurs de l'exposant α. Pour α =1, le régime est diffusif et la diffusion est brownienne ou normale (courbe rouge). Pour α <1, le régime est subdiffusif (jaune) et pour α > 1, on est dans un régime super-diffusif(bleue). Dans ces 2 derniers cas, la diffusion des particules est non-brownienne. D'après (Dix and Verkman 2008)

IV.2.3.1 **Acquisition des données**

Pour reconstruire des trajectoires, il est plus facile de suivre le mouvement des QDs dans un plan. Pour cela, j'ai suivi les déplacements individuels des QDs liés aux lipides ou aux protéines sur la partie basse des GUVs (Cf. Figure 61 A), qu'on peut assimiler à une surface plane à l'échelle des molécules (en d'autre terme, le rayon de la vésicule est très grand devant la taille des protéines ou lipides considérés).
Il est donc très important d'observer précisément le bas de la GUV afin d'avoir une image nette des Qdots dans ce plan. Comme la GUV contient peu de QDs et aucune autre molécule fluorescente, cette mise au point est un peu délicate : pratiquement, je mets au point d'abord sur le plan correspondant à la langue de la GUV dans la pipette que je repère avec quelques

QDs, puis connaissant la taille de la GUV que je peux mesurer facilement, je change de mise au point et trouve ainsi le bas de la GUV. Le réglage fin est obtenu en optimisant le focus du microscope de façon à avoir la projection des trajectoires des QDs centrée sur l'axe de la GUV. Comme mentionné auparavant, le signal émis par les QDs est enregistré avec une caméra rapide, très sensible, avec un niveau de bruit très bas. On ferme l'iris sur le trajet du faisceau incident pour n'illuminer qu'une petite zone de champ et obtenir un meilleur signal sur bruit. La caméra est contrôlée avec le logiciel Micromanager 1.3. Pratiquement nous enregistrons une séquence de 20000 images par GUV avec un temps d'exposition nominal de 4 ms qui correspond à un **temps réel entre 2 images t_{acq}=4.36 ms**, et un gain de multiplication d'électron (Gain EM) de 200. La taille d'un pixel est de 160 nm.

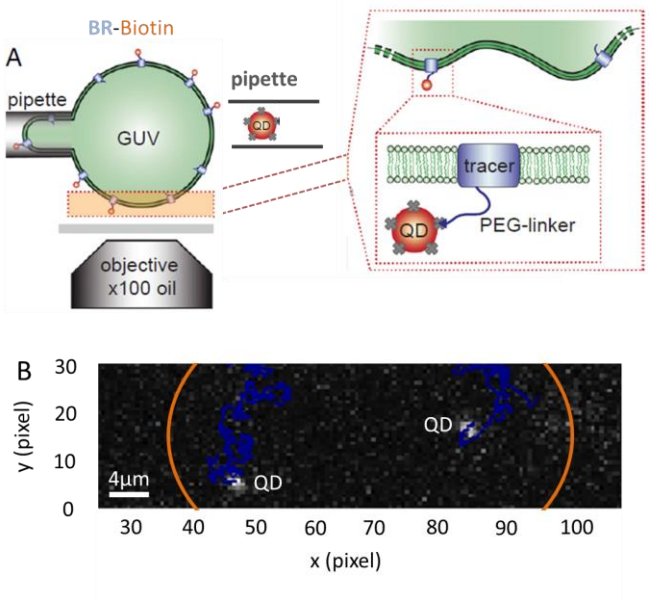


Figure 61 : Principe d'une expérience type. (A) Une GUV contenant ou non des BRs est aspirée par une micropipette pour maintenir sa position et contrôler sa tension. Les protéines ou les lipides d'intérêt (tracer) sont marqués à l'aide de Qdots injectés localement sur la vésicule par l'intermédiaire d'une seconde micropipette. (B) Exemple de trajectoire de 2 QDs. Le trait orange correspond à la limite de la zone explorée par les QDs. Les trajectoires des Qdots suite au déplacement des tracers sont représentées en bleu. La taille d'un pixel est de 160 nm. (Adapté de (Quemeneur et al. 2014)).

IV.2.3.2 **Choix de la zone d'acquisition des données - ROI**

Il faut ensuite sélectionner la zone de l'image (donc de la GUV) où nous allons détecter les positions des QDs au cours du temps. Elle est appelée ROI pour "Region of Interest". Lorsqu'on acquiert une image sur la caméra, on recueille les photons émis à partir du volume marqué en rouge sur la Figure 62, donc dans notre cas, essentiellement de la portion de membrane de la GUV qui est contenue dans ce volume. On obtient ainsi une projection sur la surface rouge (trait gras) de la même figure. Nous voulons nous limiter à une partie de cette surface où on peut considérer la membrane comme plate.
La Figure 62 montre une représentation géométrique du bas de la GUV et de la ROI. La ROI est une boîte carrée de longueur L_{xth}. Cette longueur correspond à celle de la corde c de la sphère de rayon R (la GUV): $c = L_{xth}$. On peut alors calculer la longueur du sagitta s à partir de la relation suivante :

$$c = 2\sqrt{(s(2R - s))} \qquad (37)$$

On voit bien que la taille de la ROI dépend de la taille de la GUVs. En pratique, dans le programme de détection « GUVDiffusion_v1 », le sagitta est fixé à *s*=100 nm. On peut considérer dans ces conditions que la portion de GUV considérée est plate. La taille de la ROI carrée a été ajustée de telle sorte que l'erreur maximum pour la GUV de plus petit diamètre évaluée en terme de la différence relative entre la surface projetée et la surface réelle de la GUV reste inférieure à 0.5% (Quemeneur et al. 2014). Les dimensions Lx et Ly de ROI sont alors calculées par le programme d'analyse, en fonction de R. Selon la position du centre de la ROI, la taille réelle de la ROI de dimensions Lx et Ly peut être différente des valeurs "théoriques" L_{xt}, L_{yth} décrites ci-dessus. On obtient alors assez souvent une ROI d'analyse rectangulaire ou carrée plus petite que la ROI carré théorique de côté *c*.

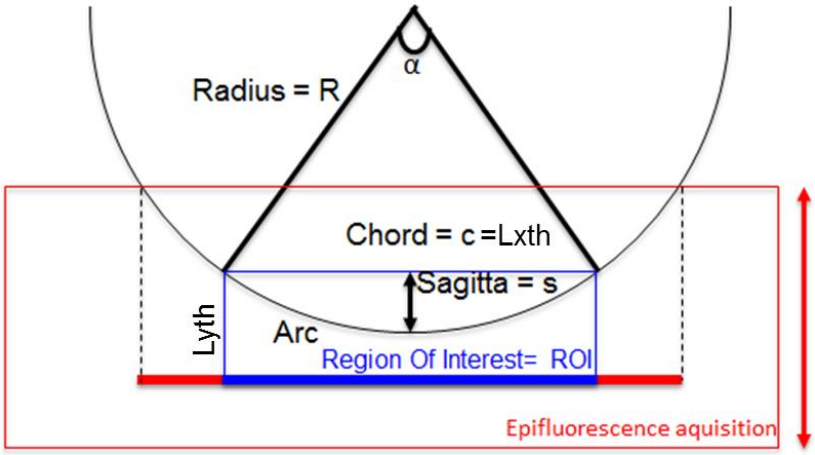


Figure 62 : Représentation de la ROI (région d'intérêt) théorique utilisée pour détecter les trajectoires des QDs. C'est un carré de côté $L_{xth}=L_{yth}=c$, *c* étant la corde de la sphère. *s* est le sagitta,.fixé à 100 nm dans notre analyse.

IV.2.3.3 **Analyse des données**

Afin de suivre le déplacement des QDs nous utilisons un programme d'analyse développé sous MATLAB (GUVDiffusion_v1) par Marianne Renner (actuellement à l'Institut du Fer à Moulin, Paris) et ajusté par François Quemeneur au laboratoire.

IV.2.3.3.1 Reconstruction des trajectoires des QDs

Le programme fonctionne en trois temps.

1. Détection des QDs et sélection des QDs au focus.

Après avoir enregistré une (ou plusieurs) séquences de 20000 images sur une GUV, nous devons détecter les particules sur chacune des images enregistrées.
La première étape du programme consiste à définir une valeur seuil au-dessus de laquelle les valeurs de niveau de gris des intensités des particules vont être considérées par la suite. Toutes les valeurs d'intensité inférieure sont alors écartées. Nous définissons également une valeur maximale d'intensité. A cette étape, les pixels ayant une intensité trop intense, due par exemple à un agrégat de plusieurs QDs, sont écartés. En pratique, j'ai fixé la valeur maximale d'intensité à 35000.
Lors de l'enregistrement des films, les données acquises avec des QDs hors focus étaient systématiquement écartées. Cette condition est également testée dans le programme

d'analyse. Nous utilisons pour cela la largeur du profil d'intensité des QDs. Lorsqu'un QD (qui peut être considéré comme quasiment ponctuel d'un point de vue optique) est parfaitement au focus, son image n'est pas un point ponctuel, mais une tache de diffraction. Cette tache de diffraction appelée "Point Spread Function" (PSF) est caractéristique du système optique utilisé.
La mesure de la PSF est obtenue en enregistrant des Qdots immobiles, dans des conditions d'imageries identiques (temps d'acquisition et illumination) aux conditions d'enregistrement des particules en train de diffuser. Pratiquement, sur notre système expérimental, la PSF a été mesurée et est égale à 1.7 pixels. Si les QDs ne sont pas au focus, la largeur à mi-hauteur de la PSF augmente et le maximum d'intensité diminue (Figure 63). C'est cette condition que nous utilisons pour écarter les particules qui ne sont pas au focus.

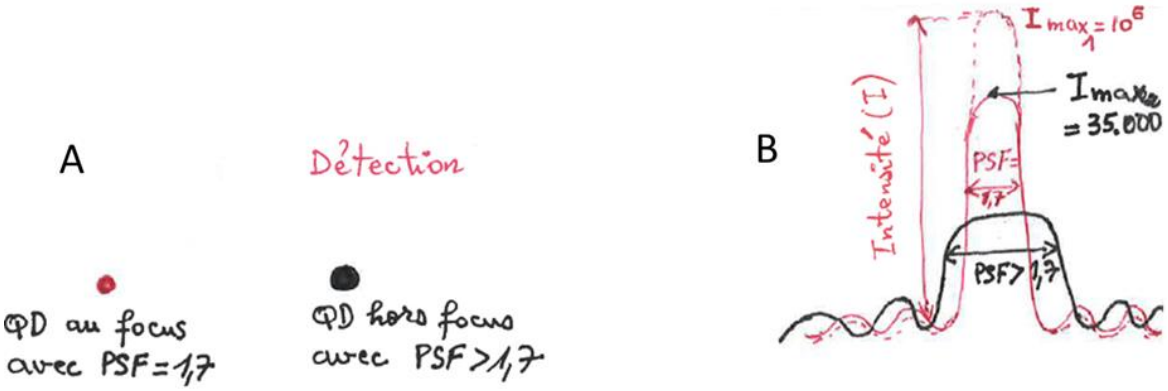


Figure 63 : Critère de sélection des QDs basé sur la PSF : les QDs au focus (point rouge) ont une PSF avec une largeur de 1.7 pixel. Lorsque les Qdots sont hors focus, (point noir) la largeur de la PSF augmente, l'intensité maximale est alors diminuée (B).

A l'issue de cette étape, nous avons donc écarté les Qdots agrégés, hors focus et éventuellement les pixels de bruit de fond avec une forte intensité. Nous avons donc pour chaque image du film, la position des QDs.

2. Suivi initial et formation de courtes trajectoires

Une fois que les critères de sélections des QDs sont bien définis et les QDs détectés, la seconde étape va consister à effectuer le suivi initial des QDs d'une image à l'autre. Les pics d'intensité des particules présents dans deux images consécutives vont être connectés de façon à former des courtes trajectoires (des trajectoires constituées de 15 points au minimum).
Je vais expliquer ci-dessous comment les courtes trajectoires ont été construites.
J'ai utilisé le logiciel de tracé à cible multiple (MTT= multiple-target tracing), basé sur le théorème de Bayes, développé par Sergé et al. (Sergé et al. 2008) et modifié par M. Renner.
Après avoir défini un coefficient de diffusion moyen (D= 3 $\mu m^2.s^{-1}$), de l'ordre de grandeur du coefficient attendu, et connaissant l'intervalle de temps entre 2 images (t_{lag}), nous pouvons tracer un cercle autour de chaque QD qui représente l'aire potentiellement explorée par une particule dans l'intervalle de temps tl_{ag} (Figure 64 B), soit dans notre cas un disque de rayon

$$R_0 = \sqrt{Dt_{acq}} = \sqrt{3 \times 4.36\ 10^{-3}} \approx 110 \text{ nm} \qquad (38)$$

Considérons qu'à l'instant t_0 le programme détecte un QD, à l'instant $t_1 = t_0 + tlag$ cette particule peut statistiquement être localisée dans le cercle de rayon R_0. Si à l'instant t_1, le programme détecte un QD dans le cercle R_0 alors deux positions sont connectées et l'on obtient un premier morceau de trajectoire dans le cercle de rayon R_0 (Figure 64 A). De même à l'instant t_1, le programme va retracer un cercle de rayon R_0 correspondant à la zone potentiellement explorée à l'instant t_3, et ainsi de suite (Figure 64 B-C).

Si deux quantums dots sont localisés dans le cercle de rayon R_0, il n'est pas possible de connaitre l'origine initiale de la particule. Aucune trajectoire n'est créée.

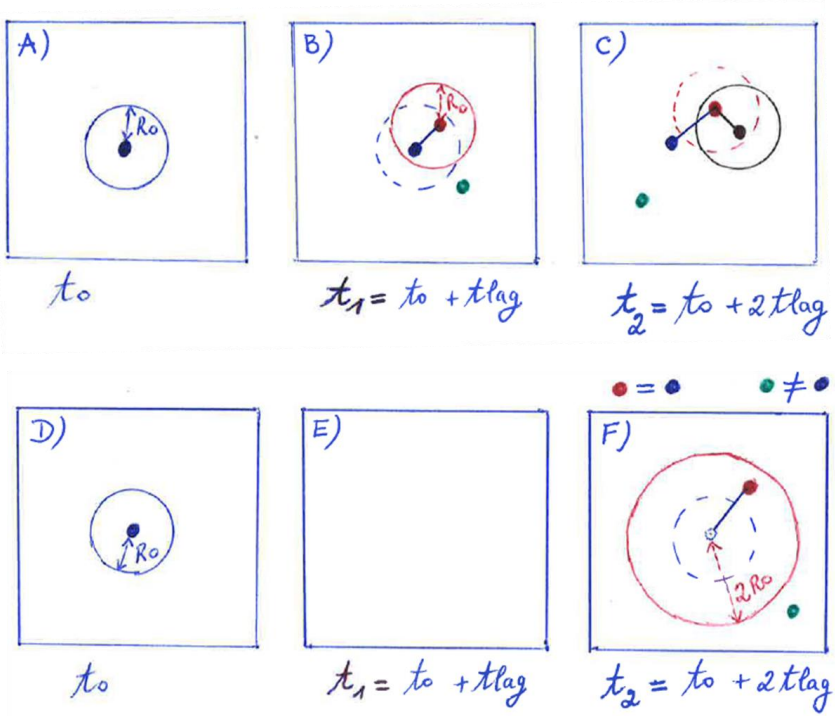


Figure 64 : Formation de courtes trajectoires à partir de la position des QDs à différents instants. (A) A l'instant t_0, une particule est localisée à une position. Entre les instants t_0 et t_1, la particule peut explorer un cercle bleu de rayon R_0. (B) Si à l'instant t_1 une particule se situe dans le cercle bleu de rayon R_0, alors on relie le centre de la particule à t_0 et à t_1 pour créer une trajectoire. La particule peut alors explorer un cercle rouge de rayon R_1 entre les instants t_1 et t_2. (C) Si une particule se situe dans ce cercle à l'instant t_3, sa position sera connectée aux 2 positions précédentes pour créer une trajectoire. Si entre l'instant t_0 et t_1, le QD s'éteint (D-E), alors à l'instant t_2, on regarde si la particule est localisée dans un cercle de rayon $2R_0$ (F).

Il faut aussi prendre en compte que les QDs ne présentent pas une intensité constante au cours du temps, mais au contraire qu'ils clignotent. Il est donc possible qu'une particule soit visible à t_0, puis éteinte donc invisible à l'instant t_1, et de nouveau visible à t_2. Dans ce cas, nous avons défini une distance maximale de clignotement de 2 pixels pour prendre en compte les trajectoires formées par des points qui sont invisibles à l'instant t_1 (voir le cercle rouge sur la Figure 64-F). Les Figure 64-D,E,F montre un schéma typique de mouvement aléatoire/clignotement d'un QD se retrouvant dans le cercle défini par le programme d'analyse. Ce qui est important à retenir c'est que même si la particule disparait à l'instant t_1 avant de réapparaître de nouveau à t_2, les QDs des deux instants sont pris en compte dans la formation de courtes trajectoires.

A l'issue de cette étape, nous avons donc de très courtes trajectoires (15 points au minimum) (Figure 64-C et F). Cela est important pour optimiser l'efficacité du calcul de MSD. Ensuite nous reconnectons des courtes trajectoires pour obtenir des trajectoires de plus de 30 points (Figure 65). J'explique la méthode ci-dessous.

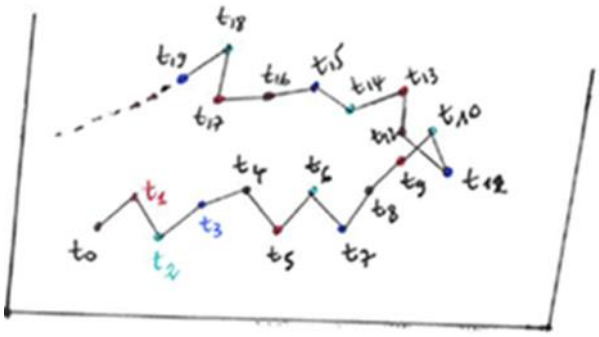


Figure 65 : reconnections de trajectoire.

3. <u>Reconnexion de courtes trajectoires et construction de longues trajectoires</u>.

Dans un troisième temps, un autre programme (BuildTrack) incorporé dans le programme va reconnecter les courtes trajectoires pour obtenir de très longues trajectoires afin d'avoir une bonne statistique dans le MSD sur les pas plus longs et sur la distribution de ces pas. Seules les trajectoires dont le nombre de points est supérieur à 30 dans la ROI sont gardées pour la suite de l'analyse (voir Figure 65 et Figure 66).

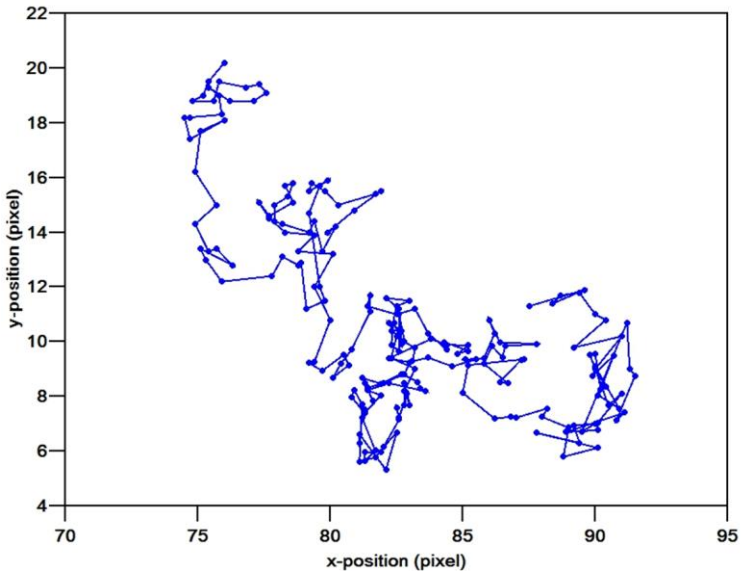


Figure 66 : Exemple de reconnexion de trajectoires obtenue sur les déplacements d'un seul QD explorant le bas d'une GUV. Un pixel correspond à 160 nm

Un exemple pratique de détection des QDs et de construction de petites trajectoires est représenté à la Figure 67

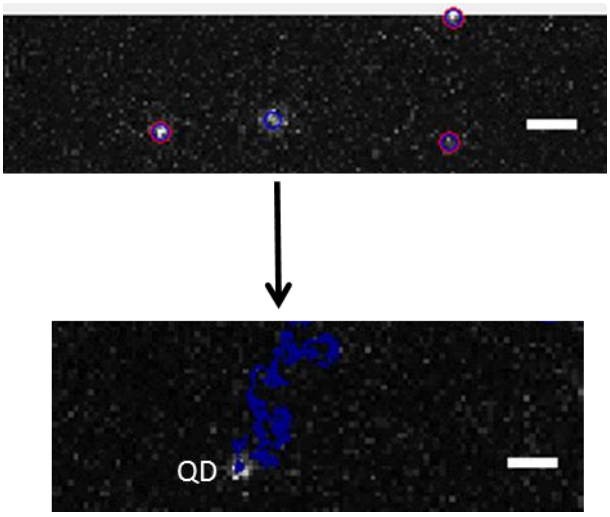


Figure 67 : Détection des pics d'intensité correspondant à des QDs (cercles rouges et bleu sur l'image du haut). Seul le cercle bleu est gardé pour le tracking et la trajectoire correspondante en bas. La barre d'échelle est de 4 µm.

IV.2.3.3.2 Calcul du MSD et du coefficient de diffusion

Comme je l'ai déjà mentionné plus haut, à partir des trajectoires reconnectées on peut calculer les déplacements quadratiques moyens (MSD) et de là, les coefficients de diffusion (D). Pour ce faire, on peut construire le diagramme de MSD pour chaque intervalle de temps (tlag) entre différentes positions de la particule (Figure 68). Ainsi tlag=1 $\times \delta t$ correspond à 2 positions successives de la particule, tlag $= 2 \times \delta t$ au temps entre 2 sauts etc... Pour chaque valeur de tlag=n$\times \delta t$, on calcule ainsi le MSD correspondant

$$MSD_{tlag} = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} \langle \Delta x^2{}_{tlag=n\delta t} \rangle + \langle \Delta y^2{}_{tlag=n\delta t} \rangle \quad (39)$$

Sur la Figure 68, on voit sur cet exemple d'une trajectoire de 7 pas, que pour tlag=1 (δt), on pourra calculer la longueur moyenne des sauts sur 7 points, par contre pour tlag= 3 (δt), on ne fera la moyenne que sur 5 sauts et enfin pour tlag= 5 (δt), ce ne sera plus que sur 3. On voit ainsi qu'il faut obtenir des trajectoires longues pour avoir une bonne statistique pour le MSD sur des temps longs.

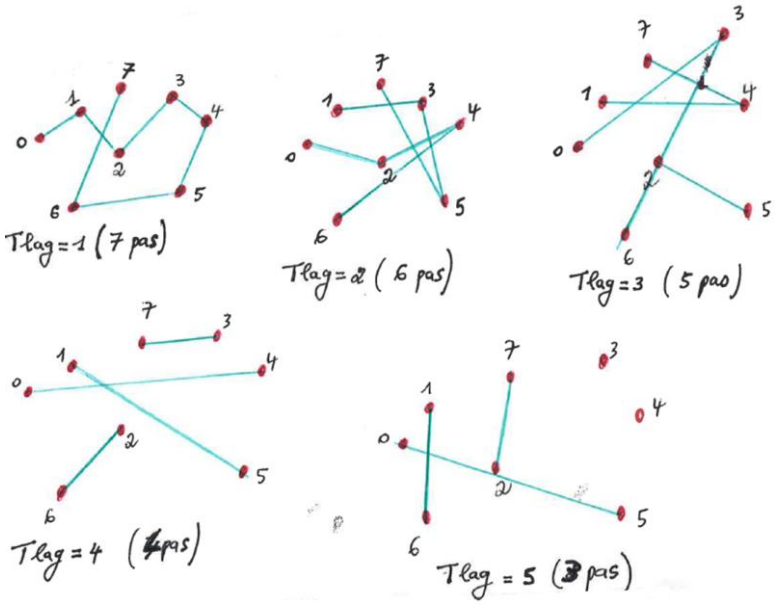


Figure 68 : Diagramme de MSD. On a représenté un exemple simple d'une trajectoire de 7 pas et pour chaque valeur de tlag, le nombre d'échantillonnage de sauts qu'on aura pour le calcul du MSD.

On peut alors tracer le MSD en fonction de toutes les valeurs de tlag (Figure 69). En pratique, dans nos expériences le MSD est linéaire sur une large gamme de tlag. Mais, comme le programme d'analyse de M. Renner a été développé pour étudier la diffusion dans des membranes cellulaires où la diffusion est plus complexe, et pour les raisons de statistique que je viens d'expliquer, la valeur du coefficient de diffusion n'est extraite qu'entre tlag=2 et tlag=5 (Wieser and Schütz 2008)(Figure 69). A partir de la variation du MSD en fonction du temps, le coefficient de diffusion D est alors défini comme la pente initiale de la partie linéaire de MSD selon l'expression suivante :

$$MSD = 4\,D\,t \tag{40}$$

où b est un facteur correcteur lié à l'imprécision de pointage de la position de la particule (Michalet 2010).

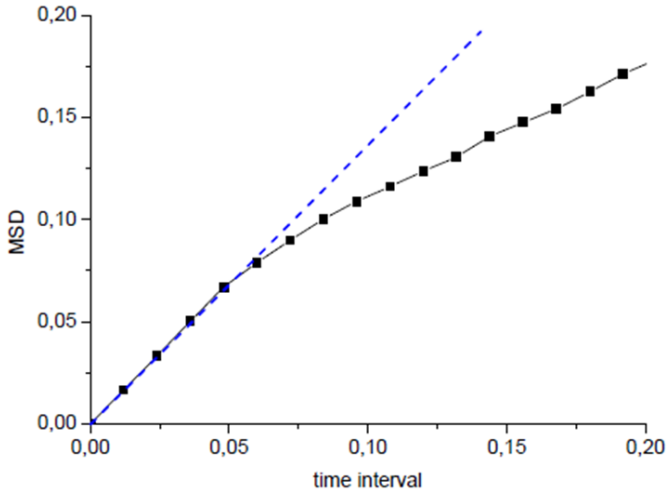


Figure 69 : MSD en fonction du temps. Cet exemple illustre un cas général où le MSD n'est linéaire que dans une certaine gamme de temps. Cette image a été prise dans le document d'aide du programme MATLAB « GUVDiffusion_v1 » de Marianne Reiner non publié (sous son autorisation).

IV.2.3.3.3 Effet de la taille de la ROI sur le coefficient de diffusion

Il est important de préciser que la taille de la fenêtre d'analyse (ROI) peut influencer la mesure du coefficient de diffusion. En effet, au laboratoire, F. Quemeneur avait observé que le coefficient de diffusion, déduit de la mesure du MSD en fonction du temps, effectué sur une même vésicule mais en changeant la taille de la ROI de largeur L_x et de hauteur L_y, diminuait fortement quand on diminuait la taille de la ROI (Quemeneur et al. 2014). On voit sur la Figure 70 extraite de (Quemeneur et al. 2014) pour une GUV de 46 µm de diamètre, qu'en passant de $L_x = L_y = 3.05$ µm (cercles oranges) à 2.35 µm (triangles rouges) puis 1.67 µm (carrés roses) et enfin à 0.98 µm (triangles bleus), les coefficients de diffusion déduits de la partie linéaire du MSD aux temps courts diminuent fortement (Cf. Figure 70) , alors que ces analyses sont effectuées sur la même expérience initiale.
Cet artefact dû au confinement artificiel dans la ROI de particules libres de diffuser, conduit à limiter la longueur des trajectoires, et donc le MSD. Dans (Quemeneur et al. 2014), les auteurs avaient utilisé une analogie avec la dynamique des polymères pour calculer le MSD en fonction de ce confinement et avaient montré que la pente du MSD à temps court était diminuée quand la taille de la boîte était réduite par rapport à la valeur attendue du coefficient de diffusion (ligne continue noire dans l'insert de la Figure 70) et tendait vers une valeur asymptotique $MSD_{asympt} = 0.0947(L_x^2 + L_y^2)$. (Cf. les pointillés horizontaux sur la Figure 70). On voit aussi sur cette figure que si le MSD sature à une valeur inférieure à MSD_{asymt} (par exemple pour la courbe orange), on peut négliger l'effet de confinement dans la mesure du coefficient de diffusion.

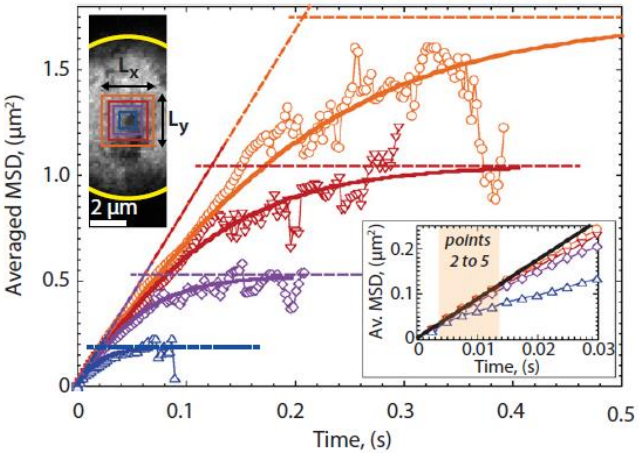


Figure 70 : MSD en fonction du temps, estimée à partir de multiples trajectoires explorant une région d'intérêt définie (ROI) de taille variable, sur la même GUV de rayon = 23 µm (extrait de (Quemeneur et al. 2014)). L'insert supérieur gauche illustre les différents ROIs considérées pour l'analyse de SPT: $L_x = L_y = 0.98$ µm (triangles bleus), 1.67 µm (carrés roses), 2.35 µm (triangles rouges) et 3.05 µm (cercles oranges); le cercle tronqué correspond à la limite de la zone explorée par QD dans la profondeur du champ du microscope. Les données expérimentales (symboles) sont comparées à un modèle (Eq. S10, ligne continue de (Quemeneur et al. 2014)) qui décrit une protéine diffusant librement en 2D sur un rectangle de longueur L_x et largeur L_y. Les lignes pointillées correspondent à un comportement linéaire du MSD à des temps courts, $MSD=4D_{eff}t$, et au comportement asymptotique $MSD_{asympt} = 0.0947(L_x^2 + L_y^2)$. L'insert inférieur droit est un zoom à temps courts ; la ligne noire correspond à la valeur de référence (sans confinement) du coefficient de diffusion $D_{eff} = 2.0$ µm²/s.

Comme la taille de la ROI dépend directement de la taille de la GUV étudiée (Cf. § IV.2.3.2), j'ai utilisé pour mes expériences des GUVs assez grosses (15 à 40 µm de diamètre) et des dimensions de ROI $Lx=Ly \geq 2.42$ µm pour que ces effets n'interviennent pas. A titre d'exemple, j'ai représenté (Figure 71) la variation du MSD en fonction du temps pour des

expériences que j'ai réalisées sur des GUVs de DOPC pur, de diamètres respectifs 15 µm (rouge) et 32 µm (noire). Les lignes pointillées bleues et oranges correspondent à la partie linéaire du MSD aux temps courts, MSD=4Dt avec D=2.7 µm^2/s pour la GUV de 15 µm (rouge) et D = 2.9 µm^2/s pour la GUV de 32 µm (noire). J'ai aussi représenté MSD_{asymt} correspondant à ces 2 expériences (lignes pointillées rouges et noires) où les tailles de la ROI étaient $L_x = L_y = 2.42$ µm (pointillés rouges) et $L_x = L_y = 3.50$ µm (pointillés noirs). On voit que les MSDs saturent bien à des valeurs inférieures à $MSD_{asym,}$ et que la plus petite GUV utilisée sature tout juste à la limite de MSD_{asym} (pointillés rouges). De plus la partie linéaire du MSD (pointillés bleus) dévie autour du 5ème point. Pour cette raison, on ne peut pas utiliser dans ce projet des GUVs plus petites que 15 µm. Dans ces conditions je suis absolument certain que les effets liés à la taille de la ROI sont écartés. Pour cette raison, je n'en parlerai plus dans la suite de mon travail et je ne présenterai que le régime linéaire et diffusif duquel les coefficients de diffusion ont été extraits.

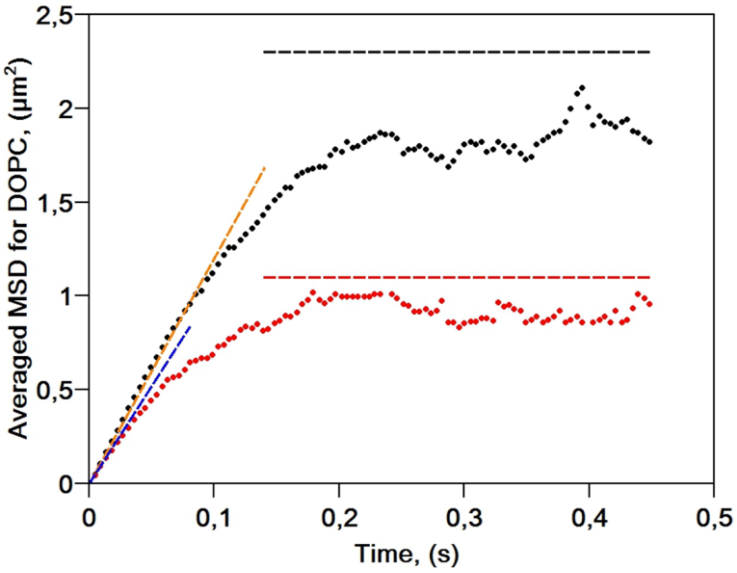


Figure 71 : MSD en fonction du temps pour 2 GUVs de DOPC, de diamètre 15 µm (rouge) et 32 µm (noire). Les lignes pointillées bleue et orange correspondent au fit à temps courts ($MSD = 4Dt$) avec D=2.7 µm^2/s pour la GUV de diamètre 15 µm (ligne pointillée bleue) et D=2.9 µm^2/s pour celle de diamètre 32 µm (ligne pointillée orange). Les lignes pointillées rouges et noires représentent les valeurs asymptotiques $MSD_{asympt} = 0.0947(L_x^2 + L_y^2)$ liées à l'effet de confinement dû à la taille du ROI de taille respectivement $L_x = L_y = 2.42$ µm (rouge) et Lx = Ly = 3.50 µm (noire).

IV.2.3.3.4 Mesure du coefficient de diffusion moyen

La méthodologie détaillée pour mesurer le coefficient de diffusion est la suivante. Pour une GUV on enregistre dix films. Chaque film est constitué d'une séquence de 20000 images. A la fin de l'analyse, on dénombre 7000 à 16000 (voir le Tableau 5 et Tableau 6) trajectoires de 30 pas dans la région d'intérêt pour les 10 films. Pour chaque QD individuel correspondant à une GUV, on calcule le MSD et le coefficient de diffusion D individuel ainsi que la valeur médiane de D. On fait de même pour 10 à 20 GUVs (Quemeneur et al. 2014) (Domanov et al. 2011).

IV.2.4 Protocole expérimental

IV.2.4.1 **Calcul de la fraction surfacique occupée par les protéines**

Le paramètre essentiel de mes expériences est la fraction surfacique occupée par les protéines sur la GUV, Φ. Brièvement, Φ est le rapport de la surface occupée par les protéines (S_P) sur la surface totale (S_T). La surface totale S_T est donc donnée par la surface occupée par les protéines (S_P) plus celle occupée par les lipides (S_L). Donc $\Phi = S_P / (S_P + S_L)$. En prenant une aire par protéine a_p=8.75 nm^2 (Richard Henderson and Unwin 1975) (Gulik-Krzywicki et al. 1987), une aire par lipide a_L=0.5 nm^2 et en tenant compte du fait qu'il y a deux feuillets dans une bicouche, le passage d'un rapport massique lipides sur protéines (LP) au rapport molaire se fait par un facteur correctif k= M_p/M_L=33, avec M_p =26000 $g.mol^{-1}$ et M_L = 786 $g.mol^{-1}$ les masses molaires respectives des protéines et des lipides. On obtient :

$$\Phi = \frac{1}{(1 + k.\,LP\,a_L/2a_P)} \qquad (41)$$

IV.2.4.2 **Choix de la protéine**

Afin d'étudier uniquement les effets de la densité des protéines sur le coefficient de diffusion, et afin de les découpler des effets liés à la déformation membranaire, tels que ceux décrits dans (Quemeneur et al. 2014), nous avons choisi d'utiliser une protéine transmembranaire de forme cylindrique qui ne déforme pas la membrane. En effet, il a été montré que dans le cas d'une protéine cylindrique, il n'y a pas d'effet de courbure sur le coefficient diffusion. C'est le cas de l'Aquaporine 0 (AQP0) (Quemeneur et al. 2014) que nous avons choisie tout d'abord pour notre étude.

Nous l'avons reconstituée dans des petits liposomes afin d'obtenir des protéo-SUVs à une forte concentration en protéine (Φ=17.5%). Nous avons ensuite préparé des GUVs à partir de cette solution par la méthode de l'électroformation sur des fils de platine comme décrit précédemment (Cf. § IV.1.3). Grâce à la méthode d'injection des QDs (Cf § IV.2.4.3), j'ai pu obtenir des vésicules avec des AQP0s marquées par des QDs. Nous avons ensuite entrepris d'aspirer ces vésicules mais à ces concentrations, les GUVs sont très fragiles et de plus, elles changent de volume quand on les aspire et maintient l'aspiration constante, tout comme des "éponges" qu'on presse (voir la Figure 72). L'AQP0 est en effet une porine qui laisse passer de l'eau quand on change la pression osmotique de part et d'autre de la membrane. La tension membranaire imposée par la micropipette induit donc un flux d'eau à travers ces protéines.

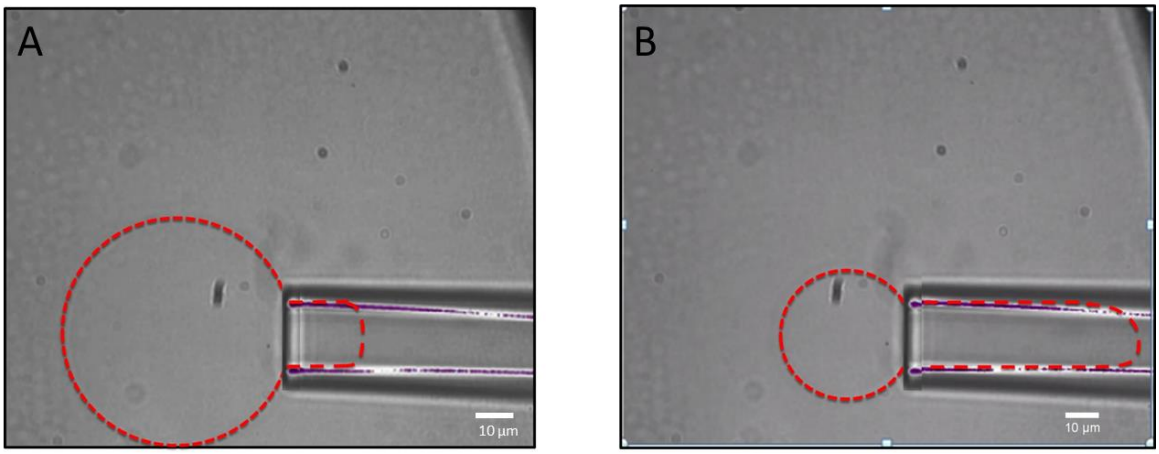


Figure 72 : Changement de volume d'une protéo-GUVs contenant l'AQP0 lors de son aspiration. (A) GUV maintenue par une micropipette à aspiration constante. (B) La longueur de la langue change au cours du temps, indiquant une perte de volume de la GUV liée à la propriété de porine de la protéine. La barre d'échelle est de 10 µm.

L'AQP0 avait déjà été utilisée par F. Quemeneur afin de réaliser des expériences similaires de SPT sur GUVs (Quemeneur et al. 2014). Cependant, il travaillait avec des densités en AQP0 très faibles ($\Phi < 1\%$) et ces problèmes n'avaient pas été observés sur la durée des expériences. Nous avions donc conclu que l'AQP0 n'était pas adaptée à notre étude où nous voulons obtenir des fractions surfaciques élevées, de l'ordre de 20%.
Nous avons donc choisi d'utiliser une protéine membranaire qui ne soit pas un canal (aqueux ou ionique) et qui a une forme cylindrique. La bactériorhodospine remplit ces conditions.

La BR est une pompe à proton photoactivable, activée par la lumière jaune –verte de longueur d'onde comprise entre 520 et 590 nm. Elle peut également former des agrégats lorsqu'elle est activée (Kahya et al. 2002). Il faut donc faire attention à l'éclairement utilisé durant nos expériences. Dans les autres gammes de longueur d'onde et à l'obscurité, elle est inactive. Comme j'éclaire les GUVs avec de la lumière bleue, de longueur d'onde comprise entre 446 et 520 nm, pour observer les QDs, je travaille avec une protéine où le cycle de pompage complet n'a pas lieu (Birge 1990), donc a priori inactive

IV.2.4.3 **Marquage par des nanoparticules fluorescentes (QDs)**

Dans la suite de ce travail, je dois pouvoir détecter les positions instantanées de la BR avec la caméra ultrasensible. Pour cela les protéines doivent être marquées avec des QD655 couverts de streptavidine.
J'ai commencé par faire le marquage des GUVs contenant une forte concentration en BR (Φ=9.6%) avec 0.025 µM de QD655 avec la méthode de centrifugation. La forte concentration en BR fragilise les GUVs et donc la centrifugation les fait exploser. Par conséquent, je recueillais très peu de GUVs et en plus ces dernières étaient relativement petites (inférieure à 10 µm de diamètre) (voir Figure 73 A).
J'ai donc mis au point la méthode d'injection avec une micropipette pour faire le marquage. La micropipette contient quelques microlitres d'une solution de QDs à $6.6.10^{-3}$ µM et complétée par de l'huile minérale afin isoler la solution de QDs à $6.6.10^{-3}$ µM de l'eau des conduits du système d'injection (Cf. Figure 57). La micropipette d'injection est rapprochée de la GUV maintenue par l'autre micropipette et on fait varier la pression en déplaçant la cuve d'eau vers le haut d'environ 5 mm pendant typiquement 15 à 30 s. De cette façon, aucun stress mécanique n'est appliqué aux GUVs et on peut contrôler la quantité de QDs liés aux protéines biotinylées. Les GUVs marquées obtenues avec ma méthode étaient relativement grandes

(environ 15 à 40 µm de diamètre) (voir Figure 73 B). Cela est important pour pouvoir écarter les effets liés à la taille de la fenêtre d'observation (ROI) sur la mesure du coefficient de diffusion comme décrit en détail (IV.2.3.2).

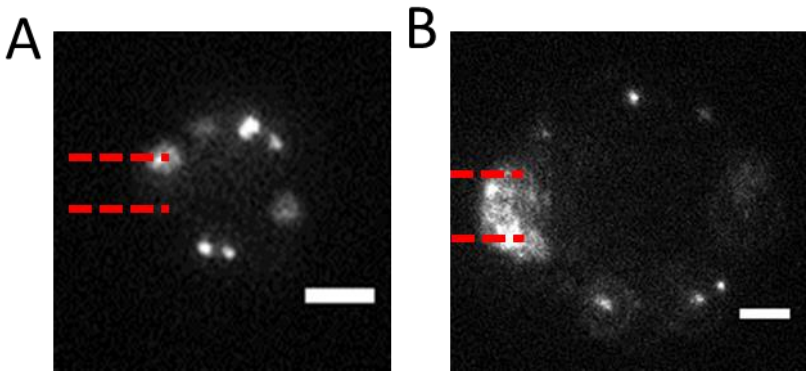


Figure 73 : Méthodes de marquage par les QDs. Les GUVs sont maintenues sur place par une micropipette (pointillés rouge). GUV typique marquée après la méthode de centrifugation (A) et d'injection (B). La barre d'échelle est de 4 µm

IV.2.4.4 **Quantification de la densité de protéines dans des GUVs**

Après la reconstitution des protéines dans des GUVs, on souhaitait pouvoir quantifier directement la densité de protéines dans chaque GUV. En effet, il existe en général une certaine dispersion sur la quantité de protéines reconstituées par GUV (Cf. par exemple (Aimon et al. 2014)). Pour cela, on peut marquer les protéines avec des marqueurs fluorescents; en effet le groupe de P. Bassereau a développé une méthode permettant de mesurer la densité des protéines dans des GUVs en mesurant leurs intensités de fluorescences (Aimon et al. 2014).
Au début de ma thèse nous disposions de protéo-SUVs d'AQP0 marquées avec de l'Alexa 488 maléimide (Invitrogen). Ce marqueur fluorescent présente un maximum d'absorption à 495 nm et un maximum d'émission dans le vert à 519 nm. J'ai tout d'abord préparé des GUVs contenant AQP0 marquée à l'Alexa. Ensuite je les ai marqués avec les QD655 dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été mentionnées dans la section IV.2.1. Le problème que j'avais rencontré est que quand j'excitais les GUVs avec la lumière bleue de l'épifluorescence à 435 nm, j'excitais à la fois les QDs mais aussi les Alexa et j'avais une image très saturée (voir Figure 74) et je ne pouvais donc pas observer les QDs isolement. Pour cela nous avons choisi de ne pas utiliser l'Alexa 488. Nous avons donc continué ce travail en utilisant des AQP0s non marquées en fluorescence puis la BR pour les raisons de GUVs « éponges » mentionnées dans la IV.2.4.2.

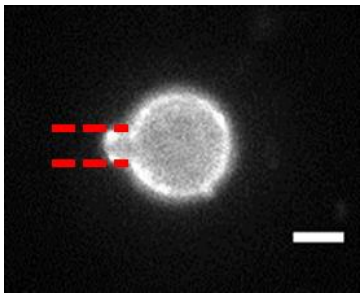


Figure 74 : Image en épifluorescence via la caméra EMCCD Andor d'une vésicule contenant l'AQP0 marquée avec de l'Alexa 488 (marqueur vert) et avec des nanoparticules fluorescentes (QD655). La longueur d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 435 ± 40 nm et 655 ± 15 nm. La barre d'échelle est de 4 µm.

La BR a un spectre d'absorption large dans le visible (Cf Figure 45) avec un maximum dans le vert à 568 nm. Elle absorbe la lumière à partir de 480 nm environ et au-delà de 600 nm. Il est donc difficile de trouver un marqueur fluorescent qui soit excité hors de la gamme d'activation de la BR. Afin de ne pas activer la BR, nous avons donc **choisi de ne pas marquer du tout la protéine avec des marqueurs fluorescents**.

En d'autre terme, dans ce projet nous n'avons pas quantifié directement la densité des protéines (Φ) dans les GUVs. Nous avons supposé que la densité initiale de protéines incorporée dans les protéoliposomes reste la même dans les GUVs obtenues après électroformation. La question maintenant est de savoir quelle erreur je fais sur mon estimation de la fraction surfacique Φ.

Erreur sur l'estimation de Φ

Dans cette section, je vais présenter les erreurs que l'on peut estimer sur la densité de protéine dans mes vésicules. Je vais pour cela discuter les résultats obtenus dans l'équipe sur deux autres types de protéines membranaires : KvAP (canal K^+ voltage-dependent) et AQP0.

Aimon et al. ont montré qu'on pouvait quantifier la densité de protéines membranaires incorporées dans des GUVs en mesurant leurs intensités de fluorescences en microscopie confocale, à condition de connaître le taux de marquage des protéines (Aimon 2011). Ils avaient reconstitué le canal potassique KvAP. La Figure 75 issue de (Aimon 2011) montre un histogramme de densité de protéines de 72 GUVs préparées dans un tampon de faible taux de salinité à partir de SUVs contenant 1600 ± 400 KvAP / μm^2, mesurée par spectroscopie d'absorption. La distribution est assez large, mais la densité moyenne des protéines dans les GUVs est de 1000 ± 700 protéines/μm^2, donc inférieure à la densité des SUVs à partir desquelles elles ont été préparées. Donc, en supposant que les densités des GUVs et des SUVs sont identiques, on commet une erreur relative de 37.5%.

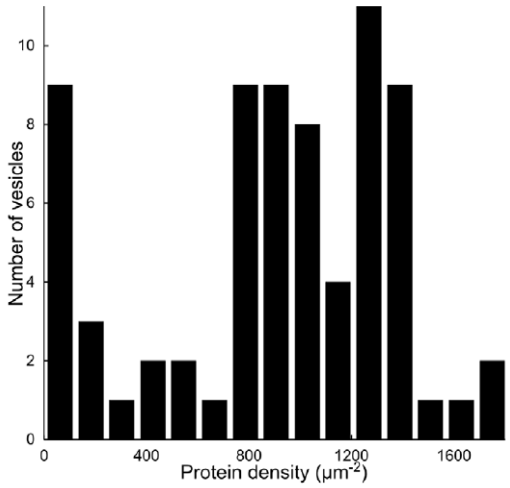


Figure 75 : Histogramme de densité de KvAPs dans des GUVs. Les GUVs ont été préparées en utilisant un tampon salin (5 mM KCl, 1 mM HEPES, 400 mM sucrose) et la densité des protéines est mesurée par microscopie confocale. La densité moyenne des protéines dans les GUVs (1000 ±700 protéines / μm^2) est comparable mais cependant inférieure à la densité de protéines dans les SUVs (EPC: EPA) à partir desquelles elles ont été formées (1600 ± 400 protéines / μm^2) (Aimon 2011).

De la même façon que précédemment, Berthaud et al. ont quantifié la densité d'AQP0 reconstituée dans des GUVs (Berthaud et al. 2016). Avec une densité initiale dans des SUVs de 1600 AQP0/μm^2, la Figure 76 montre que la densité moyenne des protéines dans les GUVs

est de 1000 ± 400 AQP0 /µm^2. Donc, il y a une différence relative de 37% entre la densité moyenne dans les GUVS et les SUVs.

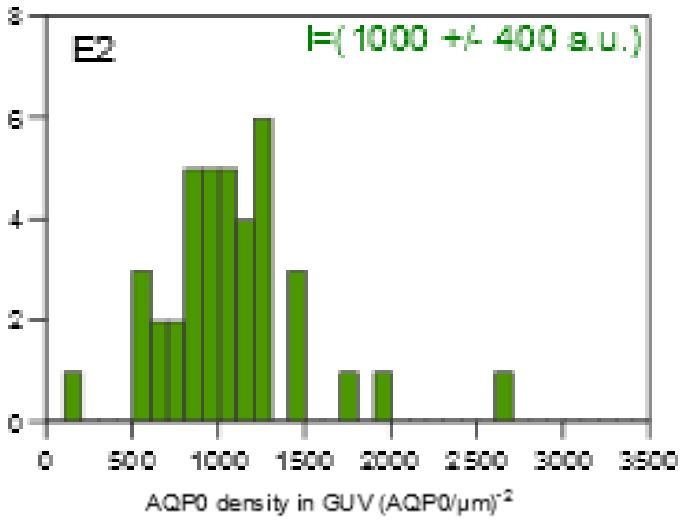


Figure 76 : Histogramme de densité d'AQP0s reconstituées dans des GUVs. La densité des protéines est mesurée par fluorescence confocale quantitative. La densité moyenne des protéines dans des GUVs (1000 ±400 protéines / µm^2) est comparable à la densité des protéines dans des SUVs (EPC: EPA) à partir desquels ils ont été formés (1600 ± 350 protéines / µm^2) (Berthaud et al. 2016).

Ces deux études montrent que l'erreur que l'on commet en supposant que la densité de protéines dans les GUVs est identique à celle des SUVs dont elles sont issues est faible, de l'ordre de 40% environ. Dans mes expériences, je n'ai pas pu quantifier la densité de BR dans les GUVs pour les raisons énoncées plus haut et j'ai donc supposé qu'elle était égale à celle des SUVs. Néanmoins, j'estime donc que l'erreur que je commets sur la fraction surfacique Φ est raisonnable, compte tenu de la large gamme de densités explorées.

V Résultats

Dans ce chapitre, je vais présenter les résultats de mes travaux. Tout d'abord, je présenterai des expériences de contrôle réalisées en l'absence des protéines. Ces expériences ont pour but de fournir une valeur de référence pour la diffusion des lipides dans des vésicules unilamellaires géantes (GUVs) à géométrie quasi-plane ne contenant pas des protéines. Dans un second temps, je présenterai les résultats sur l'effet de la densité de BR sur la diffusion des lipides dans des GUVs, dans la même géométrie. Enfin, je finirai avec les mesures de l'effet de la densité de BR sur sa propre diffusion.

V.1 Expériences de contrôle : diffusion latérale de lipides (DOPC)

J'ai effectué tout d'abord deux mesures afin d'avoir une valeur de référence sur le coefficient de diffusion latérale des lipides et de valider mon approche expérimentale. Comme expliqué au chapitre précédent, nous avons choisi le lipide DOPC pour constituer les GUVs et la technique de Suivi de Particule Unique (en anglais Single Particle Tracking (SPT)) pour mesurer la diffusion des lipides et ensuite de la bactériorhodopsine, dans la partie inférieure de GUVs où on considère que la géométrie est quasi-plane. Dans la première série d'expériences, j'ai suivi la diffusion de DSPE-PEG(2000)-biotine dans une bicouche ne contenant que du DOPC (j'assimilerai cette valeur à la valeur du coefficient de diffusion pour le DOPC), puis dans la seconde à celui du DOPC en présence de 30% de Cholestérol. Les résultats obtenus seront comparés aux valeurs de la littérature.

V.1.1 Diffusion latérale des lipides en l'absence de protéines

J'ai tout d'abord préparé des GUVs constituées seulement de DOPC, puis des GUVs contenant du DOPC + 30% cholestérol en utilisant la méthode de l'électroformation sur des fils de platine décrite au chapitre 3. Le tampon interne utilisé pour préparer ces GUVs est constitué de 400 mM de sucrose + 5 mM KCl + 1 mM Tris pH7.5 d'osmolarité 385 mOsm. Les GUVs contiennent 0.01% (en fraction molaire) de lipide biotinilé, DSPE-PEG(2000)-biotine, sur lesquels peuvent s'attacher les QDs couverts de streptavidine. Nous avons limité notre analyse à une petite zone de membrane rectangulaire (Cf § IV.2.3.2). Le programme d'analyse que j'ai détaillé au chapitre précédent permet ensuite la mesure des trajectoires de QDs liés à leur lipide ainsi que celle du MSD et de la distribution de distance parcourue (pas) pour différents intervalles tlag, où tlag=n correspond à n pas, donc à un temps total :

$$t = n.\tau \qquad (42)$$

(avec $1/\tau$, la fréquence d'acquisition de la caméra)

Pour vérifier que le mouvement des lipides était bien brownien, j'ai tracé les distributions de pas (en pixels) des QDs pour tlag=3 et tlag=10 (Figure 77). Puis j'ai effectué un fit gaussien. On note que pour les 2 compositions et les 2 valeurs de tlag considérées, le fit est bien gaussien, confirmant le caractère diffusif du mouvement des lipides dans ces membranes.

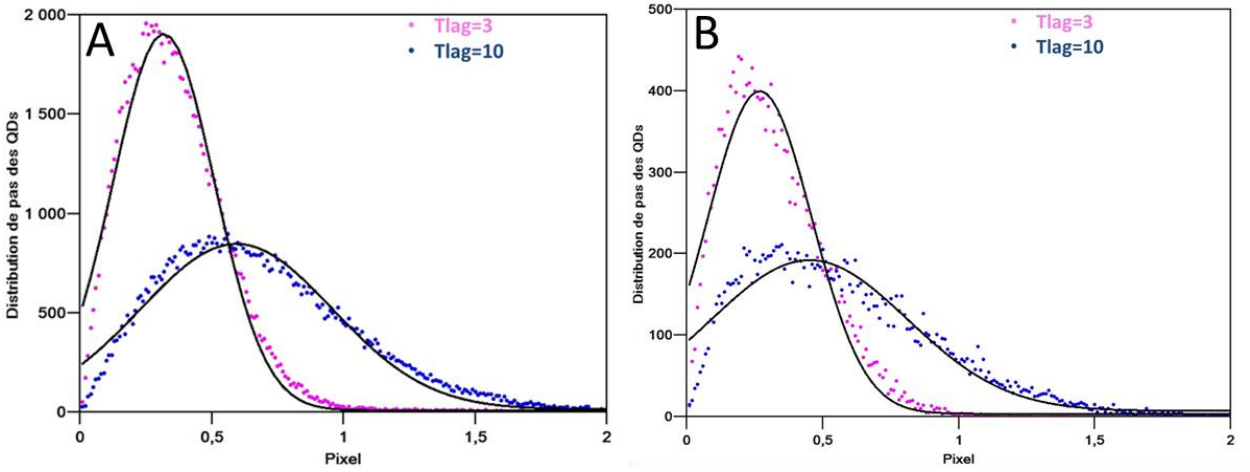


Figure 77 Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) des QDs dans une GUV constituée de DOPC (A) et de DOPC + 30% cholestérol (B) . 2 valeurs de saut ont été considérées tlag =3 (magenta), et tlag=10 (bleu). Les lignes noires sont des fits gaussiens correspondant à

$f(x) = y_0 + \frac{A\sqrt{2/\pi}}{W} exp - \left(\frac{2(X-X_c)}{W}\right)^2$, où x_c est le centre de la gaussienne, *w* sa largeur, *A* son l'aire et y_0 "l'offset". (A) Pour DOPC, pour tlag =3, on obtient $x_c = 0.320 \pm 0.002$, $w = 0.380 \pm 0.004$, $A = 915 \pm 9$ et $y_0 = 9.14 \pm 4.55$. Pour tlag =10, $x_c = 0.590 \pm 0.004$, $w = 0.730 \pm 0.009$ $A = 760 \pm 10$ et $y_0 = 14.76 \pm 3.85$. (B)) Pour DOPC + 30% cholestérol, pour tlag =3, on obtient $x_c = 0.270 \pm 0.003$, $w = 0.38 \pm 0.008$, $A = 190 \pm 4$; et $y_0 = 3.63 \pm 2.23$. Pour tlag =10, $x_c = 0.450 \pm 0.007$, $w = 0.72 \pm 0.02$, $A = 167 \pm 5$ et $y_0 = 7.15 \pm 2.27$. La taille du pixel est 160 nm.

D'autre part, on peut contrôler que la position x_c des maximas des gaussiennes qui correspond à la distance moyenne parcourue sur 3 et 10 pas respectivement est en accord avec un mouvement diffusif. On s'attend en effet à ce que $x_c^2 = Dt_{lag}\tau$ donc que le rapport $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = \frac{3}{10}$.

Nous obtenons $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.290 \pm 0.008$ pour la composition DOPC, et $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.36 \pm 0.02$ pour DOPC + 30% cholestérol, ce qui est raisonnable. Ceci confirme a posteriori le choix de mesurer le coefficient de diffusion à partir du MSD entre t_{lag}=2 et t_{lag}=5.

Ensuite, j'ai tracé la moyenne des déplacements quadratiques moyens (MSD) pour les GUVs constituées de DOPC (Figure 78, cercles rouges), et de DOPC + 30% cholestérol (cercles bleus sur la même figure) en fonction du temps, calculée à partir de 1399 trajectoires pour le DOPC seul et 746 trajectoires pour les lipides DOPC + 30 % cholestérol. Les cercles rouges correspondent aux données expérimentales obtenues avec une GUV de DOPC de diamètre 28.4 ± 0.32 µm, et un ROI Lx = Ly = 3.3 µm., les cercles bleus à celles pour une GUV de DOPC + 30% cholestérol de diamètre 29.2 ± 0.32 µm, et un ROI Lx = Ly =3.4 µm (voir la section IV.2.3.2). Aux temps courts ($t \leq 0.02$s) correspondant à 5 pas maximum, le MSD est bien linéaire et à partir du fit (lignes pointillées noires sur la Figure 78), on peut obtenir le coefficient de diffusion pour ces 2 GUVs, à partir de $MSD = 4Dt$: $D = 3.04 \pm 0.03$ µm²/s pour DOPC et $D = 1.99 \pm 0.02$ µm²/s pour DOPC + 30% Cholestérol.

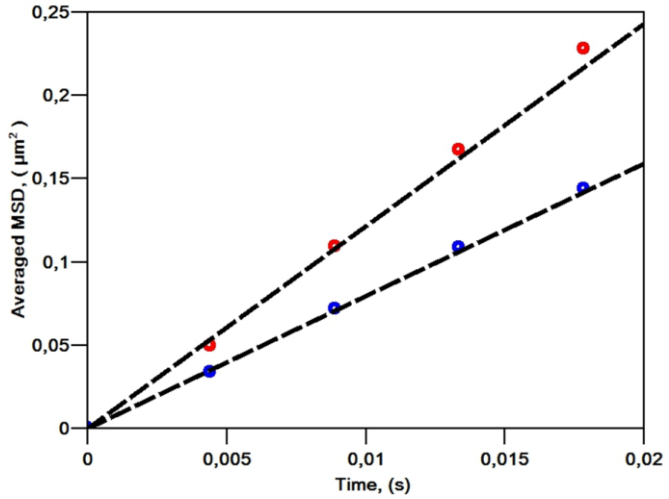


Figure 78 : Déplacements quadratiques moyens (MSD) pour une GUV constituée de DOPC (cercles rouges), et de DOPC + 30% cholestérol (cercles bleus), en fonction du temps (en secondes) estimés à partir de multiples trajectoires. Cercles rouges : GUV de DOPC de diamètre 28.4± 0.32 µm et un ROI avec, Lx = Ly = 3.3 µm. Cercles bleus : GUV de DOPC + 30% cholestérol de diamètre 29.2± 0.32 µm et Lx = Ly =3.4 µm. Les lignes pointillées noires correspondent au fit linéaire du MSD aux temps courts, $MSD = 4Dt$ avec D = 3.04 ± 0.03 µm²/s pour DOPC et D = 1.99 ± 0.02 µm²/s pour DOPC + 30% Cholestérol.

Le programme d'analyse permet donc de calculer le coefficient de diffusion médian pour une GUV. Ensuite je fais la moyenne des coefficients de diffusion médians D obtenus pour 10 à 20 GUVs indépendantes (voir § IV.2.3.3.4). Dans le cas de DOPC et DOPC + 30% cholestérol notamment, j'ai effectué la moyenne des valeurs médianes sur 18 GUVs indépendantes correspondant à 12000 trajectoires environ pour DOPC et 15000 trajectoires environ pour DOPC + 30% cholestérol. La distribution des valeurs médianes des coefficients de diffusion et leur valeur moyenne sont représentées pour les 2 compositions (Figure 79). Je peux ainsi déduire les valeurs moyennes des coefficients de diffusion des lipides : respectivement 3.08 ± 0.15 µm²/s pour DOPC seul et 1.94 ± 0.08 µm²/s pour DOPC + 30% cholestérol.

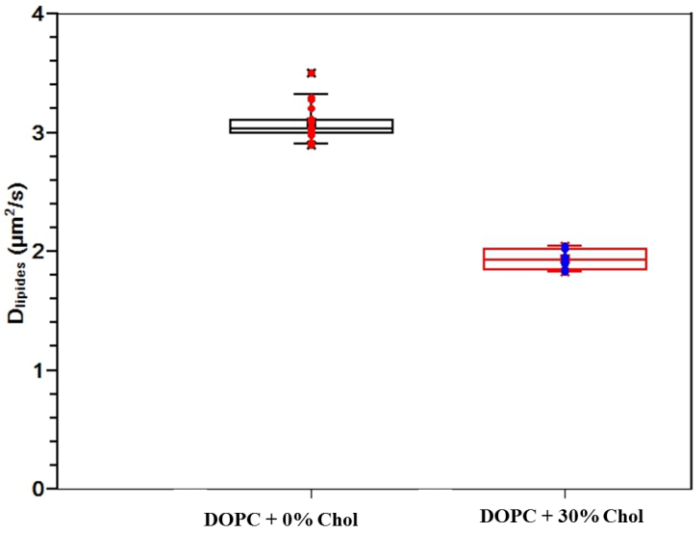


Figure 79 : Schéma récapitulant l'ensemble des valeurs de coefficient de diffusion de lipides DOPC et DOPC + 30% Cholestérol.

On voit que comme attendu (Benda et al. 2003), la présence de cholestérol induit une diminution relative du coefficient de diffusion, ici d'environ 37% en présence de 30% de cholestérol. Dans la suite, je vais essayer de discuter plus en détail ces valeurs en les comparant avec celle de la littérature sur les mêmes lipides, des lipides différents et en commentant l'impact des marqueurs fluorescents sur les coefficients de diffusion.

V.1.2 Discussion avec la comparaison avec des valeurs des littératures

La méthode de FRAP (Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment) est souvent utilisée pour mesurer le mouvement collectif des lipides dans les bicouches lipidiques. Les résultats obtenus avant les années 2000 ont montré que les lipides pouvaient diffuser librement dans la bicouche avec un coefficient de diffusion de l'ordre de quelques $\mu m^2/s$ (Lipowsky and Sackmann 1995). Ladha et al ont ainsi utilisé cette méthode pour mesurer la diffusion de DOPC (en utilisant la sonde NBD-PE) dans un système modèle de bicouche plane « suspendue » (e.g. sans contact avec un substrat) Le coefficient de diffusion de DOPC qu'ils avaient mesuré était de (13.4 ± 0.7) $\mu m^2/s$. Cette valeur apparaissait relativement insensible à la composition des phospholipides notamment aux groupes de tête (en changeant PC en PE ou PS) et au degré d'insaturation de la chaîne (en remplaçant DOPC par POPC). En revanche, le coefficient de diffusion diminuait en présence de cholestérol (pour DOPC : CHOL (1 :1) D=8.9 ± 1.1 $\mu m^2/s$) (Ladha et al. 1996). Par la suite, différentes méthodes et différents systèmes de membranes modèles ont été utilisés pour la mesure des coefficients de diffusion des lipides.

Le Tableau 3 récapitule les valeurs absolues de coefficients de diffusion trouvés dans la littérature postérieure aux années 2000, en fonction de la méthode utilisée pour préparer la bicouche lipidique ou la technique : Suivi de Particule Unique (SPT), Corrélation Spectroscopique de Fluorescence (FCS), de Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP), de Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment sur un motif à franges (FRAPP)). Différents lipides ont été étudiés, dont la structure est indiquée dans le Tableau 2.

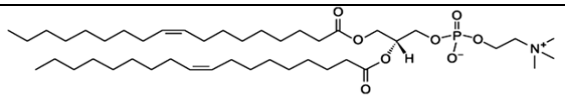
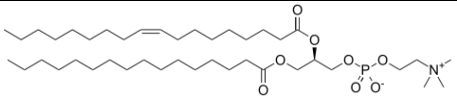
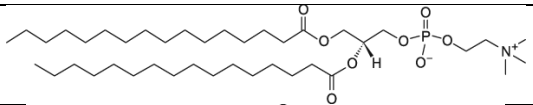
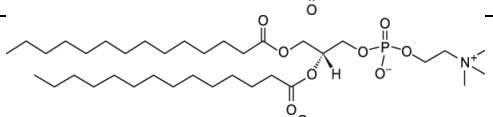
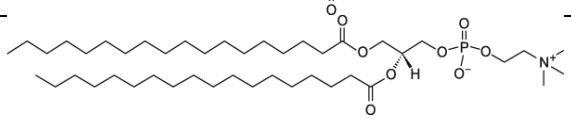
Lipides	Structures
DOPC	
POPC	
DPPC	
DMPC	
DSPC	

Tableau 2 : Structure comparée des lipides avec une tête PC, utilisés dans le Tableau 3

Type de Membrane	Composition	Marqueur	Méthode	D [$\mu m^2/s$]	Références
GUV	EPC : EPA (9 :1)	QD655	SPT	3.3 ± 1.73	(Quemeneur et al. 2014)
GUV	DOPC	DiD	FCS	10.0 ±0.4	(Heinemann et al. 2012)
GUV	DOPC	C8-BODIPY500/510 C5-HPC	FCS	7.8±0.8	(Przybylo et al. 2006)
GUV	DOPC/DOPS	DiO	FCS	6.5± 0.6	(Van Den Bogaart et al. 2007)
GUV	DOPC/DPPC	DiI	FCS	5.9±0.3	(Scherfeld et al. 2003)
	DOPC/DPPC +33 mol%Chol			2.5±0.2	
	DOPC/DPPC +50 mol%Chol			1.85±0.13	
GUV	DOPC	DOPE-Rho	FRAP and FRAPP	3.7 ± 0.5	(Pincet et al., 2016)
	DOPC	DOPE-NBD		3.4 ± 0.7	
	DOPC	DOPE-CF		3.7 ± 0.4	
Bicouche supportée	DOPC	DOPE-Rho		1.9 ± 0.3	
	DOPC	DOPE-NBD		1.9 ± 0.4	
Phase éponge	DOPC	DOPE-Rho		4.1 ± 0.4	
	DOPC	DOPE-NBD		4.2 ± 0.8	
	DOPC	DOPE-CF		5.5 ± 0.1	
Bicouche supportée	DOPC	DHPE-Rho	FCS	4.2 ± 0.4	(Benda et al. 2003)
Bicouche supportée	DMPC:DOPC	OG-DHPE	FRAP	5.9-7.2	(Nirasay et al. 2012)
Bicouche supportée	POPC	DGPE-Rho	SPT	4.1±0.39	(Guo et al. 2008)
			Z-scan FCS	4.8±1.1	
			ITIR FCS	1.5±0.5	
			FRAP	1.8±0.2	

Tableau 3 : Valeurs publiées des coefficients de diffusion mesurés avec différentes méthodes et avec différents modes de préparation des bicouches. Les références sont indiquées dans le tableau.

On voit que les valeurs des coefficients de diffusion dépendent fortement de la composition lipidique, des systèmes modèles de membrane utilisés (GUVs, bicouche supportée et phase éponge) mais aussi du marqueur et de la méthode utilisée pour préparer la bicouche.

En particulier, il est bien connu que la diffusion est très souvent beaucoup ralentie dans les bicouches supportées à cause des interactions avec le substrat (Przybylo et al. 2006). Il apparait très clairement qu'il est extrêmement compliqué de comparer les valeurs absolues du coefficient de diffusion si différents systèmes de membrane modèle sont utilisés. La comparaison semble donc plus facile avec des systèmes modèles identiques utilisant les mêmes méthodes (Heinemann et al. 2012) (Przybylo et al. 2006) (Van Den Bogaart et al. 2007). En revanche, la valeur du coefficient de diffusion peut varier de façon importante si on utilise des méthodes différentes de mesure de diffusion. En effet, Guo et al ont montré qu'en utilisant un même système de bicouche supportée de POPC, un même marqueur (Rho-PE), les valeurs absolues du coefficient de diffusion variaient énormément rien qu'en utilisant des méthodes différentes de mesure de diffusion (SPT, Z-scan FCS et (Réflexion Interne Totale-FCS (TIR-FCS)) (Guo et al. 2008). Parfois avec le même système modèle, la même composition lipidique, la même méthode utilisée mais un marqueur différent, ou une équipe différente, on peut avoir aussi des résultats légèrement différents (Heinemann et al. 2012) (Przybylo et al. 2006). Ces remarques signifient qu'il faut être prudent en ce qui concerne la comparaison des coefficients de diffusion des lipides avec les valeurs de la littérature, car il n'y a pas de consensus sur des valeurs de référence.

Nous avons quand même comparé nos valeurs avec les valeurs trouvées dans la littérature pour le même lipide. Comme je l'ai mentionné ci-dessus, les mesures de coefficients de diffusion varient beaucoup en fonction de la méthode utilisée pour préparer la bicouche lipidique ou la technique. La valeur du coefficient de diffusion que j'ai obtenue pour les GUVS de DOPC par SPT (3.08 ± 0.15 $\mu m^2/s$) est inférieure aux coefficients de diffusion obtenus dans des systèmes similaires avec la méthode de FCS (entre 7.8 et 10 $\mu m^2/s$) qui utilise des marqueurs fluorescents (Doeven et al. 2005) (Przybylo et al. 2006). Cette différence peut être attribuée à une éventuelle liaison multivalente des QDs avec les lipides biotinilés (1 QD présente en effet à sa surface plusieurs molécules de streptavidine (environ 5 à 10 streptavidines par QD) dans nos expériences. Mais on peut également suspecter un effet de la contribution de la traînée visqueuse subie par la QD dans la phase aqueuse, bien que Mascalchi et al aient montré que cet effet était probablement faible pour ces particules nanoscopiques (Mascalchi et al. 2012). Pour rappel, la taille des QDs utilisés dans ce travail est de 10 nm. Nos résultats sont néanmoins en relativement bon accord avec des mesures effectuées par FRAP au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure par F. Pincet et al (Pincet et al., 2016) qui trouvent des valeurs de coefficients de diffusions, entre 3.4 et 3.7 $\mu m^2/s$. Malheureusement, je n'ai pas trouvé d'autre publication sur la diffusion par SPT dans des GUVS de DOPC; les travaux précédents réalisés au laboratoire avec la même technique avaient utilisé un mélange EPC:EPA (Quemeneur et al. 2014).
Il est intéressant de noter des travaux de thèse non encore publiés de Vladimir Adrien réalisés en collaboration entre le Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure, le Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques de l'Université Paris Descartes (Adrien 2016). V. Adrien montre par FRAP que la diffusion de lipides fluorescents (DOPE-FITC, DSPE-NBD) de tailles respectives 0.47 nm et 0.4 nm très inférieures à celles des protéines (KvAP, TolC, OprM) de tailles respectives 4.0 nm, 2.0 nm et 2.0 nm dans des GUVs de EggPC/EggPA est plus lente que celle des protéines. Cette observation est surprenante et apparemment en contradiction avec le modèle de Saffman-Delbrück qui prévoit que les grosses inclusions membranaires diffusent plus rapidement que les petites, donc que les lipides (Saffman and Delbrück 1975) (Sonnleitner et al. 1999) (Voir la section II.2.3.1 pour détail). Une interprétation plausible est que ces lipides fluorescents diffusent non comme

des entités isolées mais en formant des « nanopatches » de lipides dont la taille pourrait atteindre jusqu'à dix fois la taille des lipides. Très probablement, ces nanopatches de lipides devraient consister en un assemblage de lipides non fluorescents entourant le lipide fluorescent. Les méthodes de FCS, FRAP et SPT mesurent en général les coefficients de diffusion de molécules fluorescentes. Toutefois, l'influence du choix du marqueur sur le coefficient de diffusion n'est généralement pas discutée en détail. Chiantia et al ont montré (Chiantia et al. 2006) que des lipides fluorescents appartenant à la famille des dialkylcarbocyanines à chaîne longue, comme DiD, DiI, DiA et DiO ou des lipides marqués avec des fluorophores tels que Bodipy, Rhodamine ou Atto avaient un effet relativement important sur la dynamique des lipides. En effet, ils ont comparé la diffusion de plusieurs marqueurs fluorescents dans des bicouches supportées sur le mica et ont trouvé des différences significatives parmi celles-ci, particulièrement prononcées dans la phase désordonnée de la bicouche et corrélées avec la charge électrostatique des marqueurs. Ainsi, des lipides marqués avec des marqueurs chargés positivement comme DiD et DiO ont une diffusion plus lente que des lipides neutres marqués avec du Bodipy, ce qui suggère que l'interaction électrostatique avec la surface de mica chargée négativement peut être responsable de l'effet observé (Chiantia et al. 2006). En conséquence, compte tenu de la multitude de paramètres qui affectent la mesure absolue du coefficient de diffusion, il nous est difficile de comparer nos mesures à celles de la littérature.

Type de Membrane	**Composition**	**Méthode**	**D [$\mu m^2/s$]**	**Diminution relative de D avec le Cholesterol (%)**	**Références**
GUV	DLPC	FCS	6.3 ± 0.2	27	(Korlach et al. 1999)
	DLPC +30 mol%Chol		4.6 ± 0.4		
Bicouche supportée	DOPC	FCS	4.2± 0.4	74	(Benda et al. 2003)
	DOPC +30 mol%Chol		1.1± 0.2		
Multicouches supportées	DMPC	FRAP	6	65	(Almeida et al. 1992)
	DMPC+30 mol%Chol		2.1		

Tableau 4 : Tableau montrant la diminution relative du coefficient du coefficient de diffusion D avec le cholestérol, mesurée par FCS ou FRAP.

Néanmoins, comme je l'ai dit précédemment, il est bien connu que le cholestérol réduit le coefficient de diffusion des inclusions (lipides ou protéines) dans des systèmes modèles (GUVs ou bicouche supportée) (Korlach et al. 1999) (Kahya et al. 2003) (Benda et al. 2003)

(Chiantia et al. 2006) (Kahya and Schwille 2006) (Carrer et al. 2008). Pour cela, comme deuxième expérience de contrôle de diffusion latérale des lipides, nous avons ajouté 30% de cholestérol au DOPC et le coefficient de diffusion moyen diminue de 3.08 ± 0.15 $\mu m^2/s$ pour le DOPC seul à 1.94 ± 0.08 $\mu m^2/s$ pour DOPC + 30% de cholestérol, soit une diminution relative d'environ 40%. Cette diminution est en accord avec celle mesurée sur des GUVs constituées de DLPC et utilisant le FCS (Korlach et al. 1999), par contre, plus faible que celle obtenue sur des bicouches supportées de DOPC par FCS (Benda et al. 2003) ou sur des multicouches supportées de DMPC par FRAP (Almeida et al. 1992). Ces valeurs sont résumées sur le Tableau 4 ci-dessus.

Ici encore, comme précédemment, on voit que les effets, même relatifs semblent dépendre de la méthode de mesure, de la composition lipidique et du système modèle de bicouche utilisés. Dans cette thèse, nous nous soucions de l'effet de la densité des protéines uniquement et non de mesures absolues. Par la suite, nous avons donc décidé de considérer non la valeur absolue de D mais sa variation relative D/D_0 où D_0 est le coefficient de diffusion latérale à très faible Φ. En principe, il ne devrait dépendre que de la densité des protéines et nous devrions mesurer une diminution de D lorsque la densité de protéines (Φ) augmente.

V.2 Effet de la densité de la Bactériorhodopsine BR sur la diffusion de DOPC

V.2.1 Résultats

Pour faire varier la fraction surfacique Φ de protéines au sein des membranes des GUVs, j'ai choisi de mélanger des protéo-SUVs avec des SUVs de lipides seuls. Pour cela, je dispose de solutions de :

- SUVs (DOPC uniquement) à une concentration en lipides de 2 $mg.mL^{-1}$
- SUVs de DOPC à 2 $mg.mL^{-1}$ et contenant 0.01mol% de PEG DSPE biotinilés (PEG Biot DSPE) afin de pouvoir les marquer avec les nanoparticules fluorescentes (QD655)
- de protéo-SUVs, avec un **rapport massique Lipides/Protéines** (**LP**) LP = 5.9 pour la protéine biotinilés (BR-Biot) et à LP = 4.7 pour la protéine non-biotinilée (BR-NM).

Il suffit donc d'ajuster les quantités respectives de SUVs pour faire varier LP, tout en gardant la même quantité de PEG Biot DSPE. Dans mes expériences, j'ai utilisé une gamme de LP dans les GUVs variant de 100 à 5, correspondant à une gamme de Φ allant de 0.011% à 17.5%.
Comme discuté précédemment (voir la section IV.2.4.4), il existe un écart pouvant aller jusqu'à 40 % entre la densité initiale de protéine dans les SUVs et celle obtenue effectivement dans les GUVs. Dans toute la suite de ce travail, les valeurs mentionnées de LP correspondent à la densité protéique nominale dans les SUVs.

Les GUVs à différentes densités de protéines sont alors produites avec la méthode d'électroformation sur fils de platine décrite au chapitre 3. La région d'intérêt considérée pour effectuer l'analyse de mes données est une petite zone de membrane rectangulaire où je peux considérer la GUV comme plate (voir la Figure 61 B et le § IV.2.3.2). Comme précédemment expliqué (paragraphe V.1.1), un programme d'analyse permet ensuite la mesure des trajectoires des lipides ainsi que la détermination du MSD et la distribution de taille des pas en fonction de Φ.

A noter que, pour les mesures du coefficient de diffusion des lipides, la valeur en absence de protéine, Φ = 0 %, correspond à la valeur précédemment obtenue dans les expériences de contrôle de la diffusion du DOPC seul (chapitre V.1).

Dans un premier temps, j'ai testé si une densité importante de BR affectait le caractère brownien de la diffusion des lipides. J'ai donc tracé les distributions des pas des QDs liés aux lipides (en pixels) en fonction de Φ (0% et 17.5%) pour t_{lag}=3 et pour t_{lag}=10. Puis j'ai effectué un fit gaussien (Figure 80). Les points magentas et bleus correspondent respectivement aux données expérimentales à t_{lag}=3 et t_{lag}=10 pour Φ = 0 et Φ =17.5% (Figure 80). On voit que la distribution de pas reste gaussienne, même à forte concentration de protéines dans la membrane, pour les 2 t_{lag} considérés, donc que la diffusion est normale. On voit aussi que lorsque Φ augmente, la position de la gaussienne se déplace vers des valeurs plus importantes donc que la longueur moyenne parcourue durant 3 pas ou 10 pas augmente, ce qui suggère que le coefficient de diffusion diminue également avec Φ. Comme nous l'avions fait au §V.1.1, nous pouvons calculer les rapports $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}}$ pour les 2 concentrations de BR. On s'attend en effet à trouver $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = \frac{3}{10}$ si le mouvement des lipides est diffusif. Nous obtenons $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.300 \pm 0.008$ pour Φ = 0%, et $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.33 \pm 0.01$ pour Φ = 17.5%. Ceci montre qu'en présence de protéines mobiles à une fraction surfacique inférieure à 20%, le mouvement des lipides reste diffusif mais est réduit par la présence des protéines.

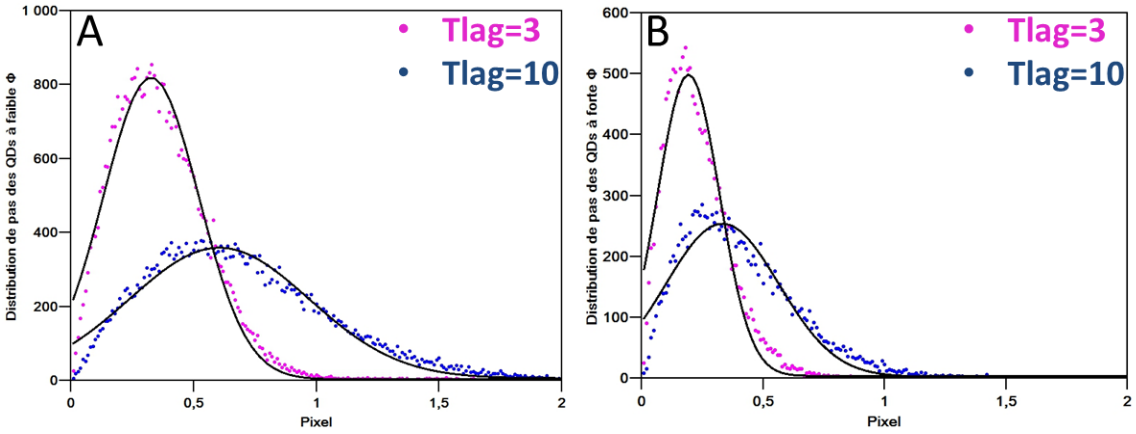


Figure 80 : Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) pour des QDs liés à des lipides dans une GUV pour deux valeurs de saut considérées tlag=3 (points magentas) et tlag=10 (points bleus) (A) Sans BR (Φ=0%). (B) à forte fraction (Φ=17.5%). Les lignes noires correspondent aux fits gaussiens avec $f(x) = y_0 + \frac{A\sqrt{2/\pi}}{w} exp - \left(\frac{2(X-X_c)}{w}\right)^2$, où x_c est le centre de la gaussienne, w sa largeur, A son l'aire et y_0 "l'offset". (A) Φ=0%, t_{lag}=3, on obtient: x_c=0.330± 0.002, w=0.390± 0.004 A= 398± 4 et y_0=3.32 ± 1.99 ; t_{lag}=10, on obtient: x_c=0.60 0 ± 0.004 , w=0.730 ± 0.009, A=324 ± 4 et y_0=6.09 ± 1.67. (B) Φ = 17.5%, t_{lag}=3, on obtient x_c=0.190± 0.002, w=0.250± 0.004, A=158± 2 et y_0=3.7± 1.91; t_{lag}=10, x_c=0.330± 0.003, w=0.460± 0.008, A=146± 2 et y_0=2.49± 1.06. La taille du pixel est 160 nm.

Ensuite, j'ai tracé le MSD en fonction du temps pour des GUVs sans protéine et à forte densité de protéines Φ = 0% et 17.5% respectivement (Points rouges et bleus sur la Figure

81). Ces données ont été obtenues pour une GUV de diamètre 28.4 ± 0.32 µm et une ROI Lx =Ly=3.3 µm à Φ = 0% et une GUV de diamètre 26.04 ± 0.32 µm, et un ROI Lx=Ly=3.18 µm à forte densité. Les lignes pointillées noires sont les fits correspondant à un comportement linéaire du MSD aux temps courts ($t \leq 0.02$ s), $MSD = 4Dt$. Quelle que soit la densité en protéine, nous trouvons que les lipides présentent donc un régime diffusif aux temps courts. Les différentes trajectoires enregistrées (1399 pour Φ = 0 % et 773 pour Φ= 17.5 %) m'ont permis de déterminer un coefficient de diffusion en utilisant la formule $MSD = 4Dt$. Ainsi D=3.04± 0.03 µm^2/s pour la diffusion des lipides à Φ = 0% et D = 2.030 ± 0.026 µm^2/s pour Φ=17.5%.

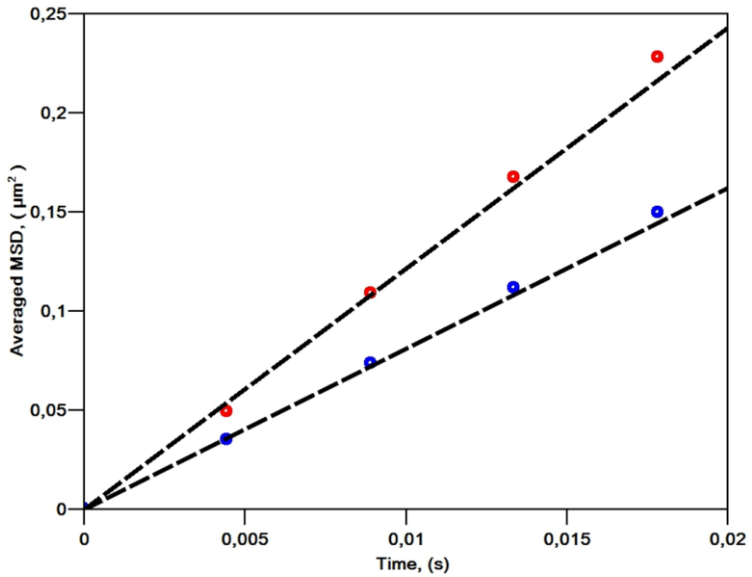


Figure 81 : 2 exemples de mobilité des lipides dans des GUVs en fonction de la présence de BR: Φ=0% (points rouges) correspondant à une GUV de diamètre 28± 0.32 µm, et à un ROI Lx = Ly = 3.3 µm (mêmes données que sur la Figure 78) et Φ=17.5 % (points bleus) pour une GUV de 26.04± 0.32 µm de diamètre, et Lx = Ly =3.18 µm. Les lignes pointillées noires sont les fits linéaires du MSD,

$MSD = 4Dt$, avec D=3.04± 0.03 µm^2/s pour Φ=0% et D=2.030± 0.026 µm^2/s pour Φ=17.5%.

Ces expériences ont été répétées à plusieurs reprises sur différentes GUVs, me permettant alors de calculer, la valeur moyenne du coefficient de diffusion. Pour les deux valeurs extrêmes de densités (Φ = 0 % et Φ = 17.5 %), 18 GUVs ont été considérées correspondant à environ 12000 trajectoires pour Φ = 0 % et à 13000 pour Φ = 17.5 %.
Pour les autres densités en protéines, la valeurs du coefficient de diffusion, D(Φ) est obtenue en faisant la moyenne des coefficients de diffusions pour 10 à 20 GUVs indépendantes avec dans chaque cas un nombre de trajectoires allant de 10000 à 16000 (voir Tableau 5).

DOPC						
LP(p/p)	LP(mol/mol)	Φ	D(Φ)[µm² /s]	Erreur sur D(Φ)	Nombre de trajectoires	D(Φ)/D₀
		0	3.08	0.15	11929	1
100	3308	0.011	2.76	0.12	9925	0.90
10	331	0.096	2.36	0.09	15980	0.77
7,5	248	0.124	2.28	0.12	15513	0.74
6	198	0.150	2.11	0.13	13807	0.69
5	165	0.175	1.89	0.19	13111	0.61

Tableau 5 : Tableau des valeurs du coefficient de diffusion D du DOPC en fonction de la fraction surfacique (Φ) correspondant à différents rapports massiques lipide sur protéine [LP (p/p)] et molaires [LP (mol/mol)]. D_0 est le coefficient de diffusion des lipides à Φ=0%.

Le Tableau 5 présente les valeurs de D(Φ). On voit ainsi que le coefficient de diffusion des lipides diminue d'environ 40% lorsque Φ augmente de 0 à 17.5 %.

V.2.2 Comparaison avec les modèles théoriques

Dans cette partie, je vais comparer mes données avec les modèles théoriques.

La Figure 82 présente la variation relative de D(Φ), normalisée par la valeur du coefficient de diffusion en absence de protéine (D_0). Les erreurs sur Φ sont calculées par rapport à la dispersion des coefficients de diffusion autour de la moyenne des coefficients de diffusion (écarts quadratiques moyens std).

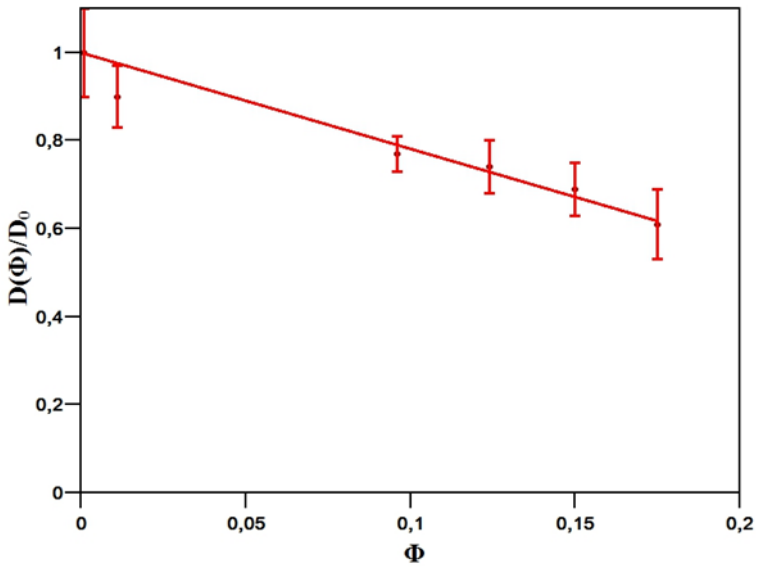


Figure 82 : Variation relative du coefficient de diffusion D des lipides en fonction de la fraction surfacique de BR (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=3.08 ± 0.15 µm²/s (fixé) dans la membrane purement lipidique. La ligne rouge correspond au fit linéaire des données par : $\frac{D}{D_0} = 1 - A\Phi$ avec A=2.19±0.14, $R^2 = 0.96$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std.

Nous avons vu au chapitre II.2.3 qu'il existe différents modèles possibles décrivant l'effet de l'encombrement en protéines sur le coefficient de diffusion. J'ai testé ces différents modèles sur mes données expérimentales.

a) Différents modèles ou simulations plus ou moins avancés prévoient une réduction linéaire du coefficient de diffusion relatif de la forme

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - A\Phi \qquad (43)$$

où A suivant les modèles varie de 2 à 2.4 environ pour la diffusion des protéines et Bussell et al ont prévu que A=2 pour les lipides (Bussell et al. 1994).

J'ai utilisé une expression de ce type pour fitter mes données (voir la ligne rouge sur la Figure 82). Cette variation linéaire rend bien compte de la variation de $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ avec Φ et j'ai obtenu A=2.19 ± 0.14, donc en relativement bon accord avec le calcul de Bussel et al.

b) Si on suppose que l'effet de la concentration des protéines n'apparait qu'en modifiant la viscosité effective de la membrane, on s'attend à avoir :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{(1 + 2\Phi)} \qquad (44)$$

Nous avons donc fitté nos données avec :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1 + A'\Phi} \qquad (45)$$

Et nous avons obtenu $A' = 3.21 \pm 0.27$ (ligne noire continue sur la Figure 83), très différente de la valeur 2 prédite par ce modèle. Sur la même figure, j'ai représenté la variation attendue (pointillés noirs, Figure 83) et on voit bien qu'elle s'écarte significativement de nos données. Il est utile de préciser qu'à l'échelle de nos expériences, la densité maximale atteinte Φ=17.5 % est élevée, pour une reconstitution de protéines membranaires en GUV. Néanmoins, du point de vue des mathématiques, Φ reste petit devant 1 et on aurait pu s'attendre ce que l'on puisse faire l'approximation :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1 + 2\Phi} \approx 1 - 2\Phi \qquad (46)$$

ce qui ne correspond pas à nos mesures. Nos résultats sembleraient donc indiquer que, pour les lipides, décrire l'effet de la concentration de protéines par une viscosité effective ne convient pas. Une autre possibilité est que la BR se comporte de façon plus compliquée dans la membrane que les modèles ne l'ont envisagé.

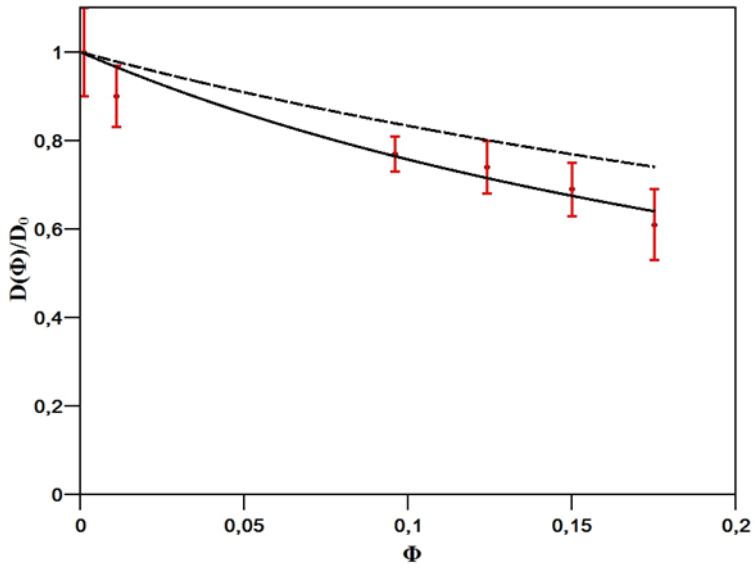


Figure 83 : Variation relative du coefficient de diffusion D des lipides en fonction de la fraction surfacique de BR (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=3.08± 0.15 µm²/s (fixé) dans la membrane purement lipidique. La ligne noire continue correspond au fit linéaire des données par : $\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1+A'\Phi}$ avec A'=3.21 ± 0.27 et la ligne noire pointillée au comportement attendu $\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1+2\Phi}$ en supposant que l'effet des protéines peut essentiellement être décrit par une viscosité effective. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std.

Après avoir étudié la diffusion des lipides dans un environnement encombré en protéines, le second objectif de la thèse était d'effectuer les mêmes études sur les protéines afin de voir si la diffusion des lipides et des protéines sont affectés de la même façon. Pour cela, nous avons étudié la diffusion latérale des BRs en fonction de leurs densités et nous présentons les résultats obtenus ci-dessous.

V.3 Effet de la densité de la Bactériorhodopsine sur sa propre diffusion

Le but de cette partie est d'étudier l'effet de la concentration des protéines sur leur propre diffusion. Pour ce faire, je fais varier Φ comme précédemment et je mesure par SPT le coefficient de diffusion de la BR marquée par un QD.

V.3.1 Résultats

Comme précédemment, j'ai tout d'abord vérifié si la diffusion des protéines restait brownienne dans une membrane encombrée. J'ai donc comparé les distributions de pas de QDs liés aux protéines (en pixels) pour 2 densités de surface Φ = 0.1% et à Φ = 17.5% et pour deux t_{lag} (t_{lag}=3 (magenta) et pour t_{lag}=10 (bleu)). Puis j'ai effectué un fit gaussien (Figure 84). La distribution des pas reste gaussienne, même à forte concentration de protéines dans la membrane, pour les 2 t_{lag} considérés. La diffusion des protéines est donc normale ou brownienne. On voit aussi que lorsque Φ augmente, la position de la gaussienne se déplace vers des valeurs plus importantes donc que la longueur moyenne parcourue durant 3 pas ou 10 pas augmente, ce qui signifie que le coefficient de diffusion diminue également avec Φ.

Comme nous l'avions fait au §V.1.1 et au §V.2.1 nous pouvons calculer les rapports $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}}$ pour les 2 concentrations de protéines. En effet on s'attend à trouver $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = \frac{3}{10}$ si le mouvement des protéines est diffusif. Nous obtenons $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.300 \pm 0.002$ pour Φ=0.1%, et $\frac{\left[x_c^2\right]_3}{\left[x_c^2\right]_{10}} = 0.290 \pm 0.009$ pour Φ =17.5%.

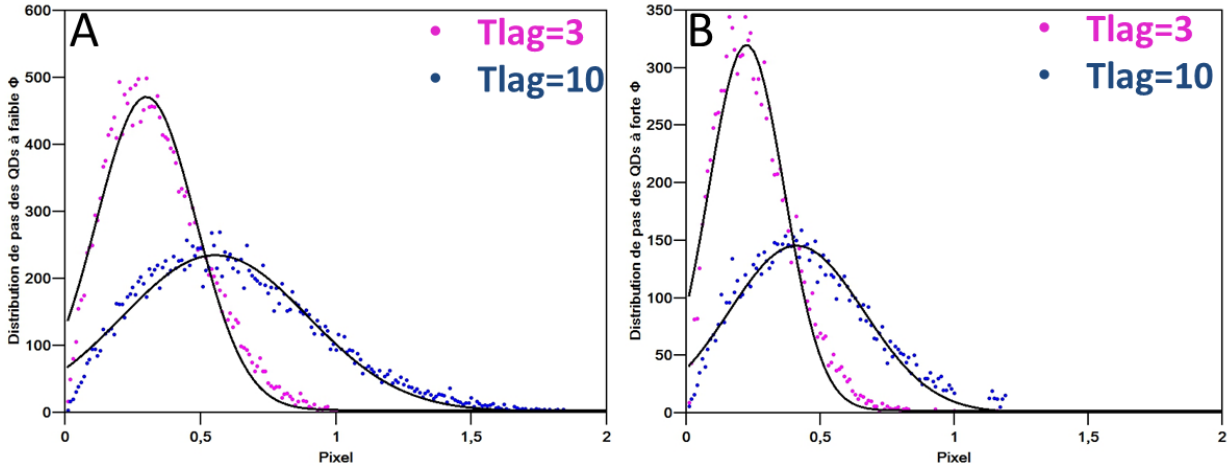


Figure 84 : Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) pour des QDs liés à des protéines dans une GUV pour deux valeurs de saut considérées tlag=3 (points magentas) et tlag=10 (points bleus) (A) A faible fraction surfacique de BR (Φ=0.1%) (B) A forte fraction (Φ=17.5%). Les lignes noires correspondent aux fits gaussiens avec l'expression utilisée à la Figure 80. (A) Φ=0.1 %, t_{lag}=3, on obtient: x_c= 0.300± 0.002, w=0.370± 0.005, A=215± 3 et y_0=3.57± 2.07 ; t_{lag}=10, x_c=0.550± 0.004, w=0.690± 0.009, A=200± 3 et y_0=2.11± 1.07. (B) Φ = 17.5%, t_{lag}=3, on obtient x_c= 0.220± 0.002, w=0.280 ± 0.005 , A=112 ± 2 et y_0=2.15 ± 1.29 ; tlag=10, x_c= 0.410 ± 0.003 , w=0.500 ± 0.006 , A=92± 1 et y_0=0.35± 0.51. La taille du pixel est 160 nm

La Figure 85 présente la moyenne des déplacements quadratiques moyens (MSD) des protéines en fonction du temps pour Φ = 0.1% (Points rouges) et Φ=17.5% (Points bleus). Ces moyennes ont été calculée pour des GUVs de diamètre 31.81 ± 0.32 µm, (ROI Lx=Ly=3.18 µm) pour Φ=0.1% et de diamètre 24.37± 0.32 µm, (ROI Lx=Ly=3.10 µm) pour Φ = 17.5 % à partir de 900 et 800 trajectoires respectivement.
Les lignes pointillées noires sont les fits linéaires du MSD aux temps courts ($t \leq 0.02$s), $MSD = 4Dt$. Comme précédemment, on voit que soit la concentration en protéine, les BRs présentent un régime diffusif aux temps courts.
Sur ces deux GUVs, j'ai mesuré D=2.73 ± 0.02 µm^2/s pour la diffusion des BRs à Φ = 0.1% et D=1.24±0.03 µm^2/s pour Φ=17.5%.

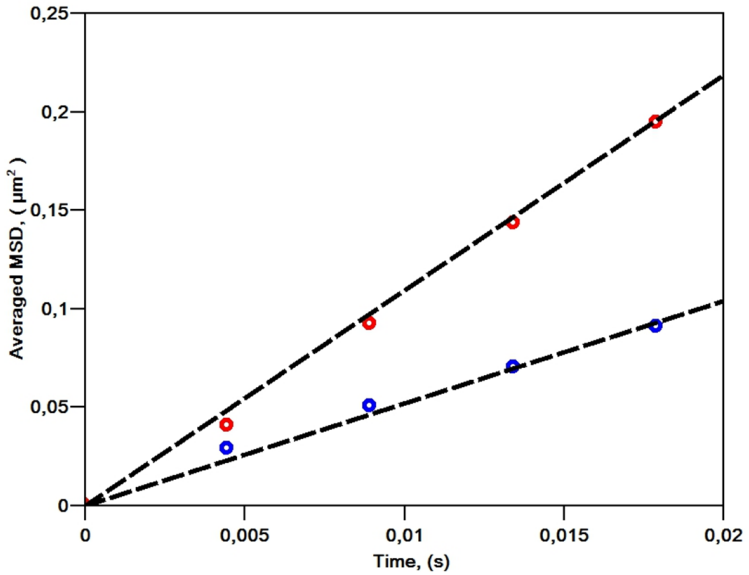


Figure 85 : 2 exemples de mobilité des protéines dans des GUVs contenant de la BR. MSD (à temps courts) en fonction du temps pour 2 densités de BR: Φ=0.1% (points rouges correspondant à une GUV de diamètre 31.81± 0.32 µm, et à un ROI Lx =Ly=3.18 µm et Φ=17.5 % (points bleus) pour une GUV de 24.37± 0.32 µm de diamètre, et Lx=Ly=3.10 µm. Les lignes pointillées noires sont les fits linéaires du MSD, $MSD = 4Dt$ avec D=2.73 ± 0.02 $\mu m^2/s$ pour Φ=0.1% et D=1.24 ± 0.03 $\mu m^2/s$ pour Φ=17.5%.

J'ai ensuite calculé, la valeur médiane du coefficient de diffusion pour chaque GUV. Dans le cas de la diffusion de BR en fonction de Φ = 0.1% et Φ=17.5%, j'ai par exemple effectué la moyenne des valeurs médianes du coefficient de diffusion sur 11 GUVs correspondant à environ 900 trajectoires à Φ =0.1 % et à 800 trajectoires pour Φ=17.5%. D(Φ) est ensuite obtenu en faisant la moyenne des coefficients de diffusions pour 10 à 20 GUVs pour des trajectoires allant de 7000 à 10000 trajectoires environ dans la gamme de Φ allant de 0.1% à 17.5% (voir (voir Tableau 6).

Les valeurs de D(Φ) sont regroupées dans le Tableau 6. Comme pour les lipides, le coefficient de diffusion des protéines diminue de façon significative quand on augmente Φ, puisqu'on observe une diminution d'environ 54% du coefficient de diffusion pour une fraction surfacique de protéines variant de 0.1 % à 17,5%.

BR						
LP(p/p)	LP(mol/mol)	Φ	D(Φ)[μm^2 /s]	Erreur sur D(Φ)	Nombre de trajectoires	D(Φ)/D_0
1000	33079	0.001	2.88	0.12	7175	1
100	3308	0.011	2.78	0.12	9509	0.97
35	1158	0.029	2.72	0.09	8368	0.94
25	827	0.041	2.66	0.07	7538	0.92
10	331	0.096	2.34	0.17	8713	0.81
7.5	248	0.124	2.03	0.13	7593	0.70
6	198	0.150	1.64	0.19	7392	0.57
5	165	0.175	1.33	0.17	7631	0.46

Tableau 6 : Coefficients de diffusion D de la BR en fonction de la fraction surfacique (Φ), correspondant à différents rapports massiques lipide sur protéine [LP (p/p)] et molaires [LP (mol/mol)]. D_0 est le coefficient de diffusion de la BR à Φ=0.1%.

V.3.2 Comparaison avec les modèles théoriques

La Figure 86 présente la variation relative de D(Φ) normalisée par D_0, le coefficient de diffusion de la BR à très faible densité (Φ=0.1%) D_0=2.88 ± 0.12 μm^2/s. Ici encore, les erreurs sur Φ sont calculées par rapport à la dispersion des coefficients de diffusion autour de la moyenne des coefficients de diffusion.

Comme je l'avais fait à la section précédente pour la diffusion des lipides, j'ai comparé la variation mesurée de D(Φ)/ D_0 aux prédictions théoriques. J'ai donc tout d'abord utilisé une expression linéaire de la forme :

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - A\Phi \qquad (47)$$

pour fitter mes données (ligne verte sur la Figure 86). J'ai obtenu une pente A=2.74 ± 0.15. La qualité du fit n'est pas très bonne et de plus, cette valeur s'écarte de la valeur prédite par les modèles, entre 2 quand on néglige les effets hydrodynamiques, 2.12 pour des simulations de Monte Carlo pour des protéines de taille moyenne, prenant en compte des obstacles mobiles (Saxton 1987) et environ 2.4 quand les effets hydrodynamiques sont introduits (Bussell et al. 1994).

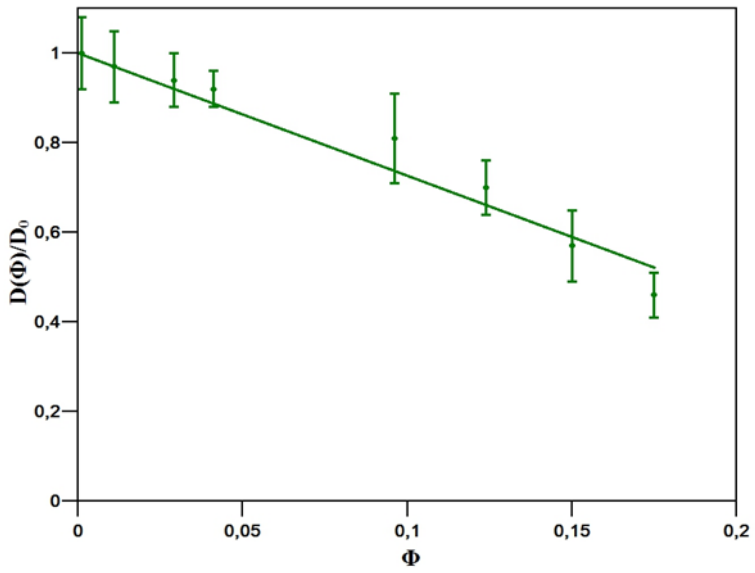


Figure 86 : Variation relative du coefficient de diffusion D de la BR en fonction de sa fraction surfacique (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=2.88 ± 0.12 µm²/s (fixé) correspondant à Φ=0.1%. La ligne verte correspond au fit linéaire des données par $\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - A\Phi$ avec A=2.74 ± 0.15, $R^2 = 0.94$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std.

J'ai également fait le fit avec:

$$\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1 + A'\Phi} \tag{48}$$

prédit par le modèle basé sur une viscosité effective (Figure 87, ligne noire). La qualité du fit obtenu est très mauvaise. De plus, la valeur du paramètre A'=4.13±0.59, est très loin de la valeur 2 prédite par ce modèle (Cf l'équation (44)).

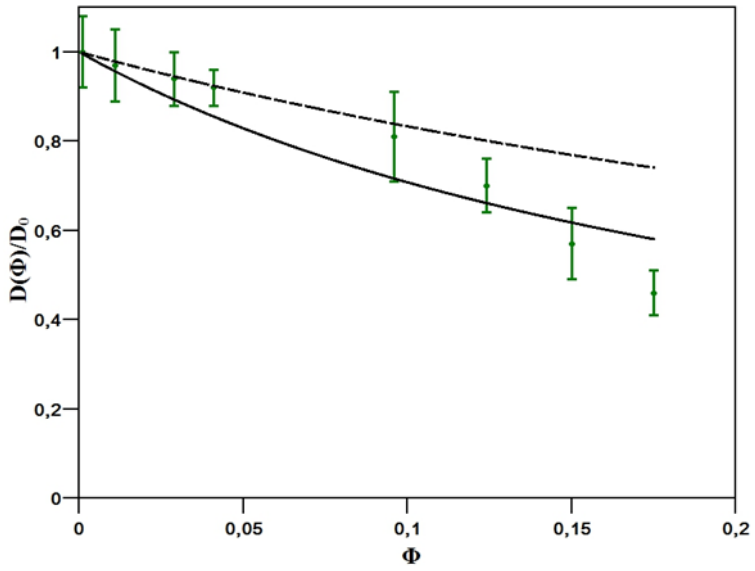


Figure 87 : Variation relative du coefficient de diffusion D de la BR en fonction de sa fraction surfacique (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=2.88 ± 0.12 µm²/s (fixé) correspondant à Φ = 0.1%. La ligne verte correspond au fit linéaire des données par $\frac{D(\Phi)}{D_0} = \frac{1}{1+A'\Phi}$ avec $A' = 4.13 \pm 0.59$, $R^2 = 0.86$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std.

J'ai donc analysé un peu différemment mes données. En effet, si nous regardons plus précisément, nous voyons sur la Figure 88 que si l'on trace la variation attendue $\frac{D(\Phi)}{D_0} = 1 - 2\Phi$ il y a un bon accord avec nos données jusqu'à environ Φ=10%, et au-dessus de 10%, il y a une nette déviation. Quelle est l'origine de cette déviation ?

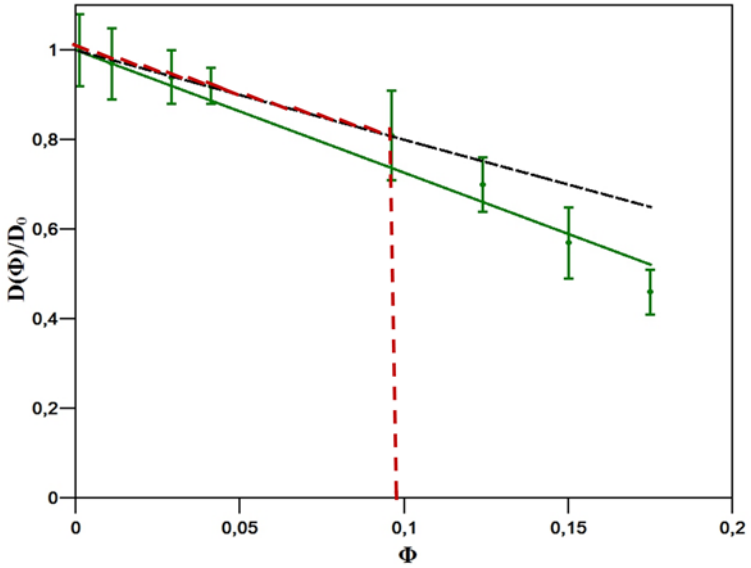


Figure 88 : Variation relative du coefficient de diffusion D/D_0 en fonction de la fraction surfacique des protéines (Φ). On observe deux régimes délimités par les pointillés rouges. Pour Φ < 10% (pointillés rouges), la courbe suit à peu près une loi linéaire en 1-2Φ (pointillés noirs) et s'en écarte au-delà.

V.3.3 Origine de la déviation

Afin de tenter d'expliquer cette déviation, on doit s'intéresser à l'organisation de la BR en membrane. Il a été montré dans (Gulik-Krzywicki et al. 1987) que la BR même non activée pouvaient s'auto-assembler spontanément pour former des agrégats. En effet, les auteurs ont effectué des expériences de microscopie électronique par congélation-fracture sur des protéoliposomes de BR à différentes fractions de Φ dans des conditions où la BR n'était pas active. Ils avaient utilisé un mélange EPC EPA (9:1). La Figure 89 issue de la référence (Gulik-Krzywicki et al. 1987) montre une série d'images de cryo-fracture correspondant à des valeurs croissantes de Φ. Sur cette figure, on voit très clairement à faible Φ des petits points correspondant aux molécules de BR isolées (Figure 89 A et B). Toutefois, quand Φ augmente, à partir de 5 %, la taille de ces points augmente, ce qui signifie qu'il y a formation spontanée d'agrégats de BR (Figure 89 C, D, E et F). Gulik-Krzywicki et al ont quantifié la taille de ces agrégats et mesuré leur distribution (Figure 89 G). On voit que la distribution est monomodale pour Φ < 5% avec une taille de 3.5 nm. Au-delà de 5%, on voit un second pic à 7,5 nm qui croit. Au-delà de 51%, on n'observe que le second pic. Il est intéressant de noter que dans cette large gamme de densité, la taille maximale des agrégats reste limitée, et que la BR ne forme pas de plus grands agrégats protéiques. Compte tenu des élargissements dus à la technique de cryofracture, les auteurs ont estimé que le pic à 3.5 nm correspondait à des monomères de BR, et celui à 7.5 nm à des agrégats contenant 3 (ou 4) molécules de BR. Il faut aussi remarquer que Kahya et al ont observé que la lumière "actinique" (jaune-verte) qui active la BR induit des agrégats de BR encore plus gros (Kahya et al. 2002). Pour cette raison en particulier, comme nous l'avons mentionné auparavant (voir § IV.2.4.2), nous travaillons

dans des conditions d'éclairement où la BR n'était pas activée. Néanmoins, dans la gamme de densité à laquelle j'ai travaillé, la membrane contient donc une fraction croissante d'agrégats au-delà de Φ=5% qui peuvent perturber la diffusion de la BR. Quelle est la conséquence de ces agrégats sur le coefficient de diffusion ? Le modèle de Nicolas Destainville dont les détails sont présentés dans (Destainville 2008) apporte quelques éléments de réponse à cette question.

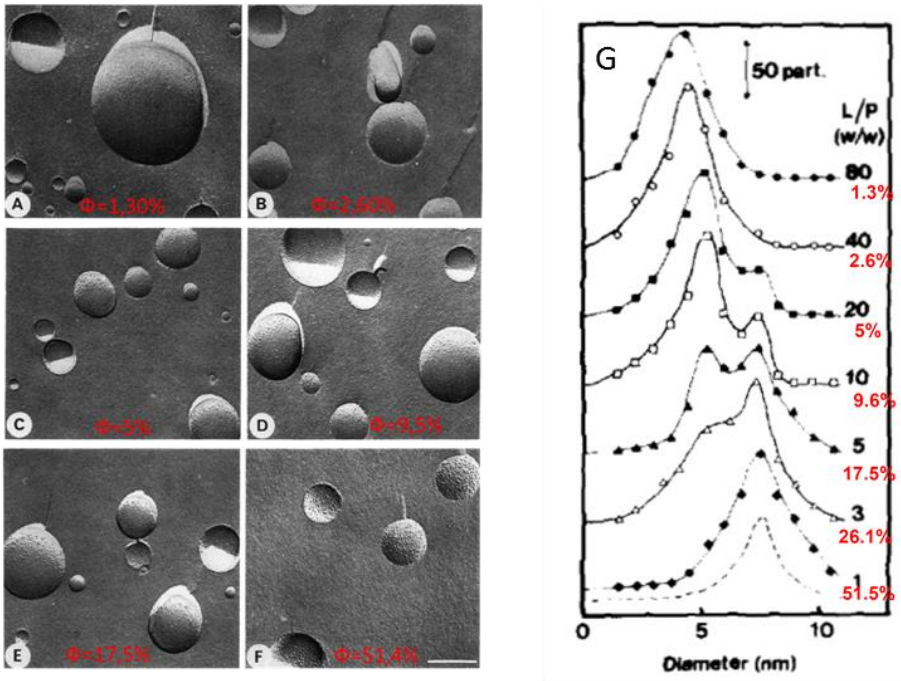


Figure 89 : Image de microscopie électronique par cryo-fracture de protéoliposomes pour différentes densités de Bactériorhodopsine (les fractions surfaciques Φ sont indiquées en rouges sur les images). A, B, C, D, E et F correspondent respectivement à des rapports lipides sur protéine (LP p/p) de 80, 40, 20, 10, 5 et 1 (G) Distribution de taille des particules de BR en fonction du rapport lipide / protéine (L/P en p/p) à partir de ces images. Les valeurs en rouge correspondent aux fractions surfaciques Φ. Le pic à faible diamètre correspond aux monomères de BR et celui de plus grande taille aux trimères (Gulik-Krzywicki et al. 1987).

V.3.4 Effet de la présence d'agrégats protéiques sur leur coefficient de diffusion (Modèle de Nicolas Destainville).

Nicolas Destainville et ses collaborateurs ont étudié théoriquement la formation de taille finie d'agrégats de protéines dans les membranes induits par la compétition entre des forces attractives (par exemple, les forces de déplétion ou le mismatch hydrophobe si l'épaisseur de la partie transmembranaire de la protéine est différente de l'épaisseur de la membrane) et des forces répulsives (par exemple, des forces liées à la déformation élastique des membranes par les protéines membranaires). Ces forces correspondent en général à des énergies faibles de l'ordre de quelques k_BT. Ces auteurs ont donc calculé la statistique de taille des agrégats et prédit que le nombre d'agrégation moyen devrait être fini et varier comme la fraction surfacique de protéines sur une large de gamme de densité (Destainville and Foret 2008) (Weitz and Destainville 2013).
Nicolas Destainville a également étudié l'effet de la taille de ces agrégats protéiques sur leur diffusion dans la membrane (Destainville 2008). Dans cet article, il a élaboré un modèle basé sur des simulations de Monte Carlo et un système de 100 à 200 particules interagissant entre elles avec différents types de forces attractives et répulsives. Les particules individuelles

diffusent avec un coefficient de diffusion D_0=1 μm^2/s. Il a ainsi observé la formation d'agrégats de particules, de taille plus ou moins fixe à l'échelle de temps de ses simulations, qui co-existent avec un gaz de monomères de particules ; des particules s'échangent en permanence entre agrégats. La Figure 90 représente une image de la phase de cluster à Φ=0.1. Ensuite il a calculé les distributions de taille n de cluster, pour trois différentes concentrations de particules (Figure 91). On voit ainsi que le nombre d'agrégation moyen augmente avec Φ. Avec ces simulations, il a donc pu montrer (comme avec l'approche analytique de (Destainville and Foret 2008)) que le nombre d'agrégation moyen (Cercles rouges dans la Figure 92):

$$\langle n \rangle \propto \Phi \tag{49}$$

Cette variation est due au fait que lorsque la densité de particules augmente, la densité de monomères reste à peu près constante mais que les agrégats grossissent. Il a ensuite calculé la diffusion moyenne d'une protéine à des échelles de temps plus longues que son temps de résidence dans un agrégat. Il a obtenu que :

$$D = \frac{D_0}{\langle n \rangle} \tag{50}$$

Avec la relation entre le nombre d'agrégation moyen et Φ (Equation (49)), il prévoit donc une relation non-linéaire entre D et Φ (Losanges noirs dans la Figure 92):

$$D = \frac{D_0}{\Phi} \tag{51}$$

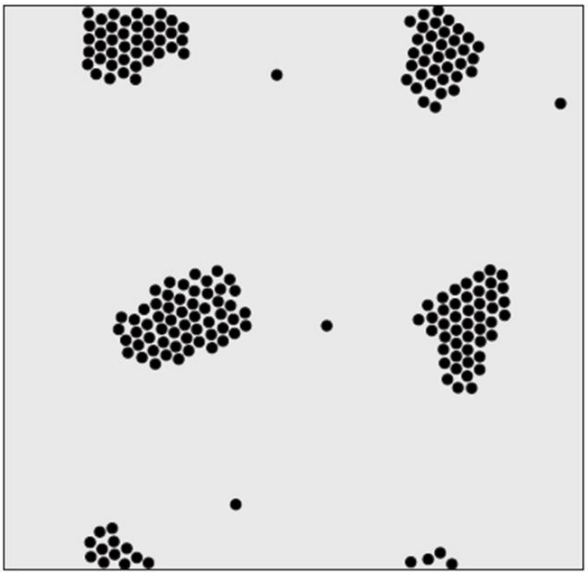


Figure 90 : Simulations de Monte-Carlo: agrégats de particules pour Φ = 0.1 (N = 200 protéines, la taille de la boîte a=0.25 μm). Les clusters diffusent lentement et apparaissent non rigides, déformables et fluctuants (Destainville 2008).

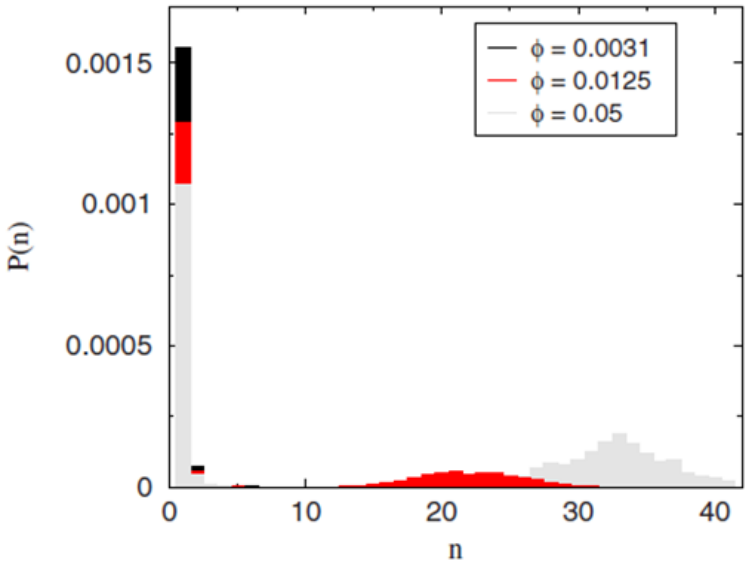


Figure 91 : Distributions de taille des clusters pour trois concentrations différentes Φ = 0.0031 (noir), Φ = 0.0125 (Rouge), Φ = 0.05 (Gris clair). Pour Φ = 0.0031, les clusters ne sont pas visibles à l'échelle étudiée parce qu'ils sont très rares (Destainville 2008).

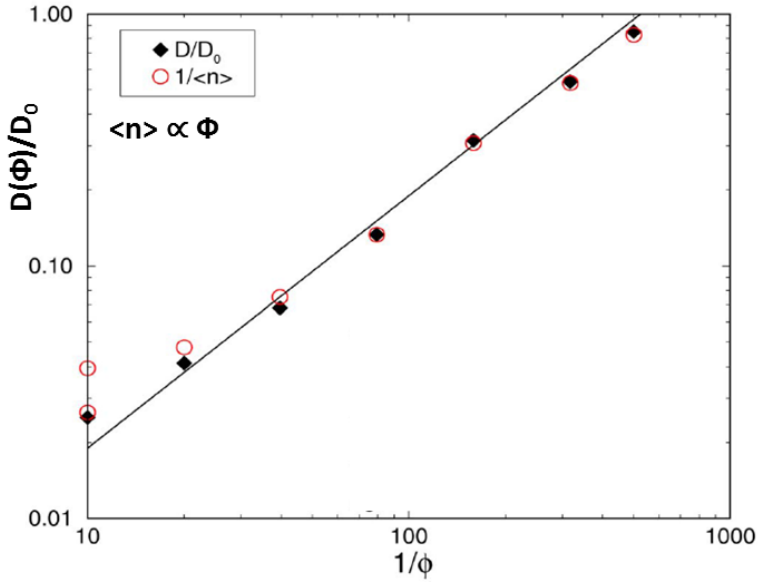


Figure 92 : Coefficient de diffusion $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ (Losanges noirs) et l'inverse de la taille moyenne des clusters $1/\langle n\rangle$ Cercles rouges) en fonction de l'inverse de la densité des protéines $1/\Phi$ (en coordonnées log-log (Destainville 2008).

La Bactériorhodopsine est un exemple un peu particulier car les expériences de cryo-fracture ont montré la formation d'agrégats (trimères), de taille fixe lorsque la densité globale de BR augmente, qui co-existent avec une fraction constante de monomères. Nous avons collaboré avec Nicolas Destainville pour l'analyse de nos résultats. Celui-ci a donc adapté son modèle et considéré que la BR est soit sous forme de monomères soit de trimères dans la membrane.
Comme le coefficient de diffusion effectif d'une protéine en fonction de son nombre d'agrégation moyen $\langle n\rangle$ est donné par :

$$D_{eff} = \frac{D_1}{\langle n\rangle} \qquad (52)$$

où D_1 est le coefficient de diffusion de la protéine sous forme monomérique, N. Destainville a obtenu :

$$\frac{D_{eff}}{D_1} = \frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi} + \frac{1}{3} \quad (53)$$

où Φ_c correspond à la fraction surfacique au-dessus de laquelle les trimères se forment. En supposant ensuite que D_1 dépend aussi de la densité de protéines à cause de l'effet d'encombrement (comme les lipides), donc que :

$$D_1 = D_0(1 - 2\Phi) \quad (54)$$

où D_0 est le coefficient de la protéine monomérique à très faible densité, il a obtenu:

$$\frac{D_{eff}}{D_0} = (1 - 2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi} + \frac{1}{3}\right) \quad (55)$$

Cette forme découle donc du double principe que :

- les protéines individuelles ont un coefficient de diffusion D(Φ) en $D_0(1 - 2\Phi)$)
- le coefficient de diffusion des trimères est D(Φ)/3, en négligeant les interactions hydrodynamiques

J'ai donc considéré 2 régimes dans mes expériences : J'ai trouvé que $\Phi_c = 10.2\%$. Pour $\Phi \leq 10.2\%$ j'ai fitté mes données avec $1 - 2\Phi$ (fit rouge, Figure 93). Pour $\Phi \geq 10.2\%$, j'ai fitté mes données avec $(1 - 2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi} + \frac{1}{3}\right)$ (ligne bleue, Figure 93) et j'ai trouvé un très bon accord. Ceci confirme indirectement la présence de clusters de BR qui ont été montrés avec les études de microscopie par fracture-congélation. Pour Φ < 10.2%, nos données sont compatibles avec la diffusion de BR en tant que monomères en fonction de la densité de BR.

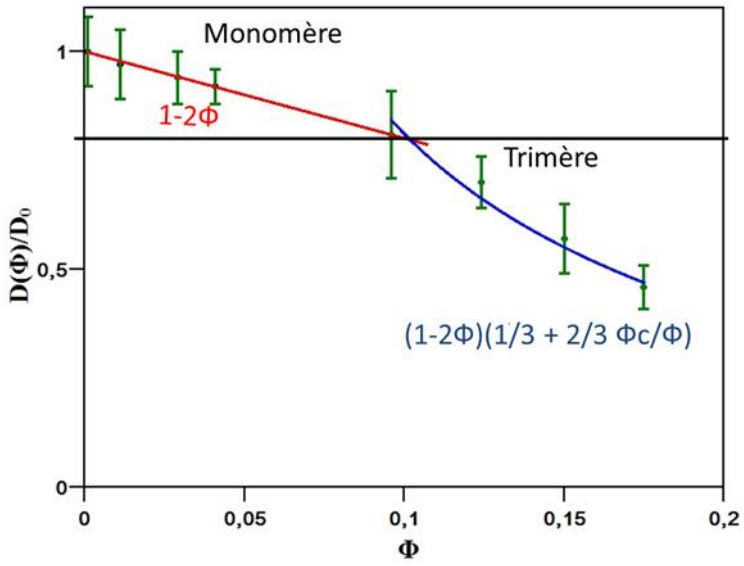


Figure 93 : Réduction du coefficient de diffusion D/D_0 en fonction de Φ. Pour Φ < 10.2% (ligne rouge) confirmation avec la théorie (1-A Φ, avec A=1.99 ± 0.04). Au-delà de 10.2% les protéines sont sous la formes de trimères et suivent une loi linéaire simple de la forme $(1 - 2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi} + \frac{1}{3}\right)$, avec Φ_c=10.2%.

V.3.5 Discussion - Conclusion

Nos expériences représentent la première validation expérimentale du modèle de N. Destainville d'une variation du coefficient de diffusion en 1/Φ liée à la présence d'agrégats de protéines dans la membrane. Dans le cas de la BR, l'existence de ces agrégats avait déjà été bien établie par les observations de cryo-microscopie et nos expériences sont en bon accord avec la présence de trimères dans la membrane. Cependant, il reste quelques points que je vais discuter ici.

- *Valeur de Φ_c* : Une première question est de comprendre pourquoi on obtient un Φ_c égal à 10.2% et non à 5% comme le prévoiraient les expériences de cryofracture de Gulik-Krzywicki et al présentées au § V.3.3. Nous pensons que cette différence de concentration critique pourrait s'expliquer par différents facteurs. Tout d'abord, il y a un problème possible avec la concentration des protéines. En effet, comme nous l'avons mentionné au § IV.2.4.4 nous avons peut-être surestimé de 40% la concentration réelle de protéines dans les GUVs car nous avons utilisée celle des protéo-SUVs, ce qui pourrait correspondre à une densité réelle à la transition Φ_c=6.1%, donc plus ou moins en accord avec les données de cryofracture. A défaut de mesurer la densité effective en BR dans chaque GUV pour lesquelles nous avons fait ces mesures, il faudrait maintenant effectuer une mesure de la valeur moyenne de Φ, soit par analyse sur gel des GUVs, soit en utilisant une méthode de fluorescence développée précédemment au laboratoire (Aimon et al. 2011).
Ensuite, il a été montré que la température et la tension de surface pouvaient avoir un effet important sur la concentration critique où les agrégats se forment (Weitz and Destainville 2013). La température à partir de laquelle les SUVs sont congelés dans l'article de Gulik-Krzywicki et al n'est pas précisée et peut donc être différente de la nôtre, tout comme la tension de membrane.
D'autre part, la densité à laquelle les agrégats de protéines se forment peut aussi dépendre de la composition lipidique. En effet, les expériences de cryo-fracture ont été réalisées avec un mélange EPC : EPA et nous utilisons le DOPC pour la reconstitution de la BR. Dans la membrane EPC : EPA, il y a une large distribution de longueurs de chaîne et d'insaturations, ce qui aurait tendance a priori à limiter les effets de "mismatch hydrophobe", car les chaines peuvent se redistribuer dans la membrane pour minimiser les déformations de la bicouche lipidique au voisinage de la protéine. Dans le cas des chaînes de DOPC, suivant la méthode utilisée, différentes valeurs d'épaisseur de la bicouche ont été proposées dépendant des caractéristiques auxquelles les méthodes sont sensibles. Cependant, on peut considérer que l'épaisseur relative aux lipides seuls (en omettant la couche d'eau) est de l'ordre de 4.6 nm (Tristram-Nagle et al. 1998) (Attwood et al. 2013) alors que la hauteur de la BR est de 5.5 nm (d'après la Protein Data Base). Avec ces lipides, il existe donc une petite différence de longueur. Mais dans ce cas, on s'attendrait donc à ce que la formation d'agrégats soit facilitée donc Φ_c plus faible et non à avoir une densité Φ_c plus élevée.
Enfin, il est possible que cette différence provienne d'un problème de précision de notre fit. En effet, nous n'avons pas de points expérimentaux entre Φ=4.1 % et 9.6%. Il aurait fallu effectuer une mesure supplémentaire, intermédiaire pour vérifier si c'est le cas, mais cela n'a pas été possible faute de temps.

- *Loi de variation des lipides*: Nous avons vu également que la diffusion des lipides suivait une loi linéaire mais avec une variation en 1-2.19Φ et non en 1-2Φ comme pour la BR dans le premier régime à basse densité (Figure 93). Dans le papier de Saxton (Saxton 1987), l'auteur avait calculé par des simulations de Monte Carlo, la diffusion de traceurs (par exemple, des

lipides) dans une membrane avec des obstacles mobiles (par exemple, des protéines). En fonction des mobilités respectives des lipides et des protéines (γ), il avait montré que la diffusion des lipides devait diminuer lorsque la fraction surfacique de protéines (c) augmente. La relation liant la diffusion relative $D(c)/D_0$ est assez complexe, mais sa variation est représentée à la Figure 94. On voit ainsi que si la diffusion de la protéine est plus lente, ce qui est le cas quand on obtient des agrégats (Cf. discussion précédente), la diffusion des lipides est aussi plus lente et on s'attend à mesurer une variation plus rapide de D* avec c (=Φ). Il est donc fort possible que la différence de pente que nous observons soit liée à la présence d'agrégats de BR et que nous ayons un accord qualitatif avec ces simulations. Malheureusement, il n'existe pas de modèle théorique où serait calculée une expression analytique pour le coefficient de diffusion des lipides en présence d'agrégats que nous puissions directement comparer à nos expériences. De plus, il faudrait réaliser des expériences supplémentaires entre 1.1 et 9.6% pour voir s'il existe un changement de régime comme celui observé pour la BR.

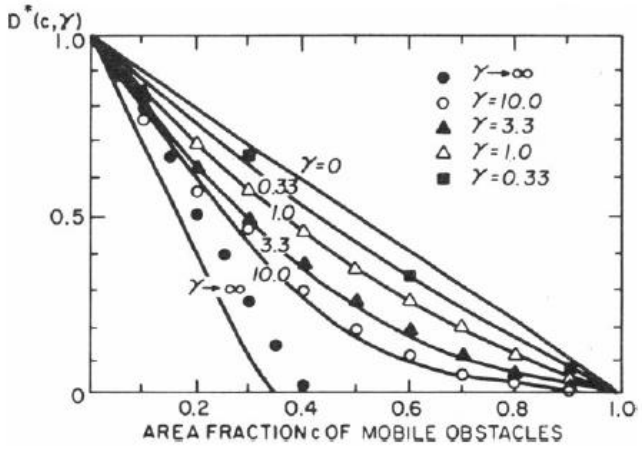


Figure 94: Variation de la diffusion des lipides D* ($D^* = D(c)/D_0$) en fonction de la fraction surfacique de protéines c (c= Φ ici) pour différentes valeurs de γ, le rapport des mobilités des lipides et des protéines. γ=∞ correspond à des obstacles fixes et γ=1 au cas où les protéines diffusent comme les lipides (Saxton 1987).

VI Conclusion générale

Durant ma thèse, j'ai étudié l'effet de l'encombrement des protéines sur la diffusion des lipides et des protéines. Ma motivation était qu'au début de ce travail, il n'existait dans la littérature qu'un seul article expérimental qui avait étudié l'effet de la concentration de protéines sur leur diffusion latérale (Ramadurai et al. 2009). Dans ce dernier, les mesures étaient réalisées par FCS (Fluorescence correlation spectroscopy) où on effectue des moyennes de temps de corrélation, mais où la trajectoire des objets n'est pas détaillée. De plus, la concentration était limitée à 3000 protéines/μm^2. Il existait aussi des travaux anciens sur la Bactériorhodopsine où des concentrations très élevées de protéines avaient été utilisées, rendant la comparaison avec les modèles théoriques compliquée. Nous avons donc décidé de répondre à cette question au moyen de SPT (Single Particle Tracking) pour pouvoir mesurer les trajectoires des protéines ou des lipides individuels sur des membranes quasi-planes et en faire une analyse détaillée. De façon à n'étudier que les effets liés à la concentration en protéines et les découpler des effets liés à la déformation membranaire, nous avons étudié la bactériorhodopsine (BR) qui a une forme globalement cylindrique et ne déforme pas les membranes. Cette protéine possède de plus la capacité de former des agrégats trimériques à des fractions de surface supérieures à 5% (Gulik-Krzywicki et al. 1987). Par ailleurs au cours de cette thèse, j'ai mis au point une nouvelle méthode pour la fonctionnalisation de GUVs par des QDs en les injectant avec une micropipette, ce qui permet de faire des expériences de SPT avec de fortes densités de GUVs.

Ce travail a permis d'approfondir certains aspects de l'effet de la concentration des protéines jusqu'à des densités de 20000 protéines/μm^2, sur la dynamique des protéines et des lipides dans des membranes modèles bien contrôlées. Nous avons montré que la présence de protéines dans les membranes avait un impact direct à la fois sur la diffusion des lipides et sur celle des protéines. Dans toute la gamme étudiée, la dynamique est brownienne. Cependant, nous avons observé des déviations par rapport aux différents modèles théoriques. Nous avons mesuré des comportements plus complexes et mis en évidence deux résultats nouveaux :

- Pour la diffusion de la BR, nous avons observé 2 régimes: un régime à basse densité où le coefficient de diffusion relatif $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ varie comme $1-2\Phi$, comme prévoit un calcul prenant en compte les effets de volume exclus (Abney et al. 1989). Au-dessus d'une certaine densité de protéines Φc=10,2%, la décroissance avec la densité est plus rapide et $\frac{D(\Phi)}{D_0} = (1-2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi}+\frac{1}{3}\right)$ en accord avec le modèle de N. Destainville avec une variation en 1/Φ lorsque des clusters de protéines se forment spontanément dans la membrane (Destainville 2008). C'est effectivement le cas pour la BR pour laquelle il est établi que des trimères se forment au-delà de 5%. L'écart entre cette valeur et Φ_c mesurée provient probablement de notre surestimation de la densité de protéines dans les GUVs. Mes expériences montrent donc que les modèles simples de diffusion même omettant les effets hydrodynamiques (Bussell et al. 1994) rendent bien compte de la diffusion de protéines monomériques et que des mesures de diffusion à différentes densités de protéines permettent de détecter la formation de clusters de protéines et leur distribution de tailles.
- Dans le cas des lipides, une décroissance linéaire de $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ rend bien compte de nos mesures, mais la pente obtenue est plus importante, -2.19 au lieu de -2 telle que prévoit un modèle hydrodynamique très complet de Bussell et al. (Bussell et al. 1994). Une

possibilité à cet écart provient probablement de la présence des agrégats de BR qui induisent des effets non triviaux sur la diffusion des lipides. Un modèle théorique reste à développer pour prédire la variation attendue pour $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ dans ce cas, et des données supplémentaires à acquérir pour tester cette prédiction sur toute la gamme de densités.

A l'avenir, il reste encore des expériences à réaliser avec la BR pour pousser encore le modèle de N. Destainville. Il a été montré que l'éclairage de la protéine avec de la lumière actinique (jaune-vert) active ses propriétés de pompage et induit la formation de clusters beaucoup plus gros (Kahya et al. 2002). On s'attendrait donc à une décroissance beaucoup plus forte de la diffusion lorsque la BR est éclairée. On pourrait donc en principe remonter à la distribution de taille de ces agrégats "actifs" à partir de la mesure de $\frac{D(\Phi)}{D_0}$. Plus généralement, cette méthode semble bien adaptée pour détecter la formation d'agrégats protéiques, même de petite taille comme des trimères. Différentes origines à la formation de clusters de protéines membranaires ont été proposées. En mesurant la diffusion en fonction de la densité, on pourrait ainsi étudier l'effet de la concentration sur l'agrégation de protéines et mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. En outre, il serait aussi intéressant de regarder ces effets avec d'autres méthodes (par exemple FCS et FRAP) afin de comparer les résultats obtenus.
Enfin, il faudrait bien évidemment tester les prédictions des différents papiers théoriques avec des membranes où les protéines ne forment pas de clusters. Pour cela, il faudrait choisir une protéine membranaire cylindrique a) de façon à ne pas induire des clusters par membrane interposée, b) qui ne tende pas à être sous forme cristalline dans son état naturel comme la BR, donc pour laquelle les interactions protéines-protéines sont plus limitées, c) qui ne soit pas une porine de façon à ce qu'on puisse aspirer les GUVs et d) des lipides pour former les GUVs qui produisent une bicouche sans "mismatch hydrophobe" avec cette protéine. Trouver les bonnes candidates reste encore un problème intéressant!

VII Bibliographie

Abney, J. R., Scalettar, B. A., & Owicki, J. C. (1989). Self diffusion of interacting membrane proteins. *Biophysical journal*, *55*(5), 817–833.

Adrien, V. (2016, June 22). *Diffusion des lipides et interaction protéine-protéine dans des membranes modèles*. Thèse de Doctorat-Université Paris Descartes.

Aimon, S. (2011). *Study of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles*. Thèse de Doctorat-Université Pierre et Marie Curie.

Aimon, S., Callan-Jones, A., Berthaud, A., Pinot, M., Toombes, G. E., & Bassereau, P. (2014). Membrane shape modulates transmembrane protein distribution. *Developmental cell*, *28*(2), 212–218.

Aimon, S., Manzi, J., Schmidt, D., Larrosa, J. A. P., Bassereau, P., & Toombes, G. E. (2011). Functional reconstitution of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PloS one*, *6*(10), e25529.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition.). New York: Garland Science.

Almeida, P. F., Vaz, W. L., & Thompson, T. E. (1992). Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry*, *31*(29), 6739–6747.

Almén, M. S., Nordström, K. J., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2009). Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology*, *7*(1), 50.

Ambroggio, E., & Bagatolli, L. (2009). Giant unilamellar vesicles, fluorescence microscopy and lipid-peptide interactions. In “Membrane-active peptides: methods and results on structure and function" (pp. 179–200).

Andersen, O. S., Koeppe, R. E., & others. (2007). Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *36*, 107–130.

Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, *81*, 303–311.

Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, F., & Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. In *Trends in Colloid and Interface Science VI* (pp. 127–131). Springer.

Attwood, S. J., Choi, Y., & Leonenko, Z. (2013). Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 3514–3539.

Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., & Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, *16*(9), 1055–1069.

Bache, R. M. (1894). The secret of the Brownian movements. *Proceedings of the American Philosophical Society*, *33*(145), 163–177.

Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., & Schwille, P. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophysical Journal*, *87*(2), 1034–1043.

Baeriswyl, D., Droz, M., Malaspinas, A., & Martinoli, P. (Eds. . (1986). *Tenth Gwatt Worshop : Physics in Living Matter* (Vol. 284). Switzerland. Springer-Verlag.

Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, *77*(4), 2090–2101.

Balaz, S. (2009). Modeling kinetics of subcellular disposition of chemicals. *Chemical Reviews*, *109*(5), 1793–1899.

Barak, L. S., & Webb, W. W. (1982). Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, *95*(3), 846–852.

Bates, I. R., Wiseman, P. W., & Hanrahan, J. W. (2006). Investigating membrane protein dynamics in living cells This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB—Membrane Proteins in Health and Disease. *Biochemistry and Cell Biology*, *84*(6), 825–831.

Baumgart, T., Hammond, A. T., Sengupta, P., Hess, S. T., Holowka, D. A., Baird, B. A., & Webb, W. W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(9), 3165–3170.

Baumgart, T., Hess, S. T., & Webb, W. W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, *425*(6960), 821.

Béja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., et al. (2000). Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, *289*(5486), 1902–1906.

Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J. P., Landau, E. M., & Pebay-Peyroula, E. (1999). Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure*, *7*(8), 909–917.

Belzons, M., Blanc, R., Bouillot, J.-L., & Camoin, C. (1981). Séances de l'Académie des sciences. Série 2b-939- Viscosité d'une suspension diluée et bidimentionnelle de sphère. Page 940-943.

Benda, A., Beneš, M., Marecek, V., Lhotskỳ, A., Hermens, W. T., & Hof, M. (2003). How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir*, *19*(10), 4120–4126.

Berthaud, A., Quemeneur, F., Deforet, M., Bassereau, P., Brochard-Wyart, F., & Mangenot, S. (2016). Spreading of porous vesicles subjected to osmotic shocks: the role of aquaporins. *Soft Matter*, *12*(5), 1601–1609.

Betzig, E. (2015). Nobel Lecture: Single molecules, cells, and super-resolution optics. *Reviews of Modern Physics*, *87*(4), 1153.

Bieszke, J. A., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A., & Spudich, J. L. (1999). A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry*, *38*(43), 14138–14145.

Birge, R. R. (1990). Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1016*(3), 293–327.

Blaurock, A. E. (1975). Bacteriorhodopsin: A trans-membrane pump containing α-helix. *Journal of Molecular Biology*, *93*(2). Accessed 3 October 2017

Brady, J. F. (1983). The Einstein viscosity correction in n dimensions. *International journal of multiphase flow*, *10*(1), 113–114.

Brown, D. A., & London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *Journal of Membrane Biology*, *164*(2), 103–114.

Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, *68*(3), 533–544.

Brown, R. (1828). A Brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827 on the particles contained in the pollen of plants. *The Philosophical Magazine, Série 2*, *4*, 161–173.

Bussell, S. J., Hammer, D. A., & Koch, D. L. (1994). The effect of hydrodynamic interactions on the tracer and gradient diffusion of integral membrane proteins in lipid bilayers. *Journal of Fluid Mechanics*, *258*, 167–190.

Camley, B. A., & Brown, F. L. (2013). Diffusion of complex objects embedded in free and supported lipid bilayer membranes: role of shape anisotropy and leaflet structure. *Soft Matter*, *9*(19), 4767–4779.

Canham, P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *Journal of Theoretical Biology*, *26*(1). Accessed 16 July 2017

Carrer, D. C., Schmidt, A. W., Knölker, H.-J., & Schwille, P. (2008). Membrane domain-disrupting effects of 4-substitued cholesterol derivatives. *Langmuir*, *24*(16), 8807–8812.

Cevc, G. (1987). How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer. *Biochemistry*, *26*(20), 6305–6310.

Cevc, G. (1991). How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry*, *30*(29), 7186–7193.

Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T., & Rees, D. C. (1998). Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, *282*(5397), 2220–2226.

Chiantia, S., Ries, J., Kahya, N., & Schwille, P. (2006). Combined AFM and Two-Focus SFCS Study of Raft-Exhibiting Model Membranes. *ChemPhysChem*, *7*(11), 2409–2418.

Daumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D., & Salomé, L. (2003). Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophysical Journal*, *84*(1), 356–366.

Davoust, J., Devaux, P. F., & Leger, L. (1982). Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. *The EMBO Journal*, *1*(10), 1233.

Démery, V., & Dean, D. S. (2010). Drag forces on inclusions in classical fields with dissipative dynamics. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, *32*(4), 377–390.

Démery, V., & Lacoste, D. (2018). *Mechanical factors affecting the mobility of membrane proteins*. Allemagne: (Springer-Verlag, Berlin, in press).

Destainville, N. (2008). Cluster phases of membrane proteins. *Physical Review E*, *77*(1), 011905.

Destainville, N., & Foret, L. (2008). Thermodynamics of nanocluster phases: A unifying theory. *Physical Review E*, *77*(5), 051403.

Devaux, P. F., & Morris, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, *5*(4), 241–246.

Deverall, M. A., Gindl, E., Sinner, E.-K., Besir, H., Ruehe, J., Saxton, M. J., & Naumann, C. A. (2005). Membrane lateral mobility obstructed by polymer-tethered lipids studied at the single molecule level. *Biophysical Journal*, *88*(3), 1875–1886.

Dix, J. A., & Verkman, A. S. (2008). Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annual Review of Biophysics*, *37*, 247–263.

Doeven, M. K., Folgering, J. H., Krasnikov, V., Geertsma, E. R., van den Bogaart, G., & Poolman, B. (2005). Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, *88*(2), 1134–1142.

Domanov, Y. A., Aimon, S., Toombes, G. E., Renner, M., Quemeneur, F., Triller, A., et al. (2011). Mobility in geometrically confined membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(31), 12605–12610.

Dommersnes, P. G., & Fournier, J.-B. (1999). N-body study of anisotropic membrane inclusions: Membrane mediated interactions and ordered aggregation. *The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems*, *12*(1), 9–12.

Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., & Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, *298*(5599), 1759–1762.

Duplantier, B. (2005). Le mouvement brownien, "divers et ondoyant"-Séminaire Poincaré (pp. 155–212). France.

Ebrey, T. G. (1993). Light energy transduction in bacteriorhodopsin. *Thermodynamics of membrane receptors and channels*, 353–387.

Edman, K., Nollert, P., Royant, A., & Belrhali, H. (1999). High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature*, *401*(6755), 822.

Ehrenberg, B., & Meiri, Z. (1983). The bleaching of purple membranes does not change their surface potential. *FEBS Letters*, *164*(1), 63–66.

Einstein, A. (1956). *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Courier Corporation.

Elson, E. L., & Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, *13*(1), 1–27.

Enderlein, J., Gregor, I., Patra, D., Dertinger, T., & Kaupp, U. B. (2005). Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *ChemPhysChem*, *6*(11), 2324–2336.

Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, *438*(7068), 578.

Essen, L.-O., Siegert, R., Lehmann, W. D., & Oesterhelt, D. (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), 11673–11678.

Evans, E. A. (1989). [1] Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods. *Methods in Enzymology*, *173*, 3–35.

Evans, E. A., Waugh, R., & Melnik, L. (1976). Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophysical Journal*, *16*(6), 585–595.

Evans, E., & Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, *64*(17), 2094.

Fournier, J.-B., Ajdari, A., & Peliti, L. (2001). Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Physical Review Letters*, *86*(21), 4970.

Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., & Kusumi, A. (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *The Journal of Cell Biology*, *157*(6), 1071–1082.

Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sierecki, E., Gov, N. S., Genest, M., et al. (2006). Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(7), 2098–2102.

García-Sáez, A. J., & Schwille, P. (2008). Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. *Methods*, *46*(2), 116–122.

Garten, M., Aimon, S., Bassereau, P., & Toombes, G. E. (2015). Reconstitution of a transmembrane protein, the voltage-gated ion channel, KvAP, into giant unilamellar vesicles for microscopy and patch clamp studies. *Journal of Visualized Experiments:*, (95), 52281–52281.

Girard, P. (2004). *Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif*. Thèse de Doctorat-Université Paris-Diderot.

Gohon, Y., Dahmane, T., Ruigrok, R. W., Schuck, P., Charvolin, D., Rappaport, F., et al. (2008). Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties. *Biophysical Journal*, *94*(9), 3523–3537.

Gonen, T., Cheng, Y., Kistler, J., & Walz, T. (2004). Aquaporin-0 membrane junctions form upon proteolytic cleavage. *Journal of Molecular Biology*, *342*(4), 1337–1345.

Gorter, E., & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, *41*(4), 439–443.

Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., et al. (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell*, *135*(6), 1085–1097.

Goulian, M. (1996). Inclusions in membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *1*(3), 358–361.

Goulian, M., Bruinsma, R., & Pincus, P. (1993). Long-range forces in heterogeneous fluid membranes. *Europhysics Letters*, *22*(2), 145.

Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., & Henderson, R. (1996). Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology*, *259*(3), 393–421.

Gulik-Krzywicki, T., Seigneuret, M., & Rigaud, J. L. (1987). Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(32), 15580–15588.

Guo, L., Har, J. Y., Sankaran, J., Hong, Y., Kannan, B., & Wohland, T. (2008). Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: a comparative study. *ChemPhysChem*, *9*(5), 721–728.

Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(6), 456–462.

Hanulová, M., & Weiss, M. (2012). Membrane-mediated interactions–a physico-chemical basis for protein sorting. *Molecular Membrane Biology*, *29*(5), 177–185.

Havlin, S., & Ben-Avraham, D. (2002). Diffusion in disordered media. *Advances in Physics*, *51*(1), 187–292.

Heinemann, F., Betaneli, V., Thomas, F. A., & Schwille, P. (2012). Quantifying lipid diffusion by fluorescence correlation spectroscopy: a critical treatise. *Langmuir*, *28*(37), 13395–13404.

Heinemann, F., Vogel, S. K., & Schwille, P. (2013). Lateral membrane diffusion modulated by a minimal actin cortex. *Biophysical Journal*, *104*(7), 1465–1475.

Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *28*(11–12), 693–703.

Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. a, & Downing, K. H. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of Molecular Biology*, *213*(4), 899–929.

Henderson, R., & Unwin, P. N. T. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, *257*(5521), 28–32.

Hess, S. T., & Webb, W. W. (2002). Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, *83*(4), 2300–2317.

Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., & Uhlén, M. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, *26*(3), 501–510.

Honigmann, A., Mueller, V., Ta, H., Schoenle, A., Sezgin, E., Hell, S. W., & Eggeling, C. (2014). Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nature Communications*, *5*, 5412.

Iino, R., Koyama, I., & Kusumi, A. (2001). Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophysical Journal*, *80*(6), 2667–2677.

Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and surface forces* (2nd edition.). London : Academic Press.

Janand, A. (2013). La carrière intra organisationnelle en mouvement: les apports du mouvement brownien à l'étude de la mobilité interne des cadres des grandes entreprises françaises. *Management & Avenir*, (6), 96–117.

Javanainen, M., Hammaren, H., Monticelli, L., Jeon, J.-H., Miettinen, M. S., Martinez-Seara, H., et al. (2013). Anomalous and normal diffusion of proteins and lipids in crowded lipid membranes. *Faraday Discussions*, *161*, 397–417.

Jones, D. T. (1998). Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Letters*, *423*(3), 281–285.

Jørgensen, I. L., Kemmer, G. C., & Pomorski, T. G. (2017). Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques. *European Biophysics Journal*, *46*(2), 103–119.

Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., & Schwille, P. (2003). Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(30), 28109–28115.

Kahya, N., & Schwille, P. (2006). How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, *16*(5), 671–678.

Kahya, N., Wiersma, D. A., Poolman, B., & Hoekstra, D. (2002). Spatial organization of bacteriorhodopsin in model membranes light-induced mobility changes. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39304–39311.

Khorana, H. G. (1988). Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(16), 7439–7442.

Kimura, Y., Vassylyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., & others. (1997). Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature*, *389*(6647), 206.

Kono, M., Misra, S., & Ebrey, T. G. (1993). pH dependence of light-induced proton release by bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, *331*(1–2), 31–34.

Korlach, J., Schwille, P., Webb, W. W., & Feigenson, G. W. (1999). Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(15), 8461–8466.

Kouyama, T., Bogomolni, R. A., & Stoeckenius, W. (1985). Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, *48*(2), 201–208.

Kriegsmann, J., Gregor, I., Von der Hocht, I., Klare, J., Engelhard, M., Enderlein, J., & Fitter, J. (2009). Translational diffusion and interaction of a photoreceptor and its cognate transducer observed in giant unilamellar vesicles by using dual-focus FCS. *ChemBioChem*, *10*(11), 1823–1829.

Kühlbrandt, W. (2000). Bacteriorhodopsin—the movie. *Nature*, *406*(6796), 569–570.

Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Chadda, R., Xie, M., Tsunoyama, T. A., Kalay, Z., et al. (2012). Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 215–250.

Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., et al. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review Biophysics Biomolecular Structure*, *34*, 351–378.

Kusumi, A., Sako, Y., & Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal*, *65*(5), 2021–2040.

Kwok, R., & Evans, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophysical Journal*, *35*(3), 637–652.

Ladha, S., Mackie, A. R., Harvey, L. J., Clark, D. C., Lea, E. J., Brullemans, M., & Duclohier, H. (1996). Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophysical Journal*, *71*(3), 1364–1373.

Lagny, T. J., & Bassereau, P. (2015). Bioinspired membrane-based systems for a physical approach of cell organization and dynamics: usefulness and limitations. *Interface Focus*, *5*(4), 20150038.

Landau, L. D. (1933). On the motion of electrons in a crystal lattice. *Phys. Z. Sowjetunion*, *3*, 664–665.

Lang, T., & Rizzoli, S. O. (2010). Membrane protein clusters at nanoscale resolution: more than pretty pictures. *Physiology*, *25*(2), 116–124.

Lin, L. C.-L., & Brown, F. L. (2004). Dynamics of pinned membranes with application to protein diffusion on the surface of red blood cells. *Biophysical Journal*, *86*(2), 764–780.

Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P., & Simons, K. (2008). Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(29), 10005–10010.

Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, *327*(5961), 46–50.

Lipowsky, R., & Sackmann, E. (1995). *Structure and dynamics of membranes: I. from cells to vesicles/II. generic and specific interactions*. Elsevier.

Liu, C., Paprica, A., & Petersen, N. O. (1997). Effects of size of macrocyclic polyamides on their rate of diffusion in model membranes. *Biophysical Journal*, *73*(5), 2580–2587.

Liu, Z., Gandhi, C. S., & Rees, D. C. (2009). Structure of a tetrameric MscL in an expanded intermediate state. *Nature*, *461*(7260), 120–124.

Luecke, H., Richter, H.-T., & Lanyi, J. K. (1998). Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science*, *280*(5371), 1934–1937.

Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., & Lanyi, J. K. (1999). Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science*, *286*(5438), 255–260.

Macháň, R., & Hof, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1798*(7), 1377–1391.

Magde, D., Elson, E. L., & Webb, W. W. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*, *13*(1), 29–61.

Manneville, J.-B. (1999, June 21). *Fluctuations de membranes actives*. Thèse de Doctorat-Université Paris-Diderot.

Manneville, J.-B., Bassereau, P., Levy, D., & Prost, J. (1999). Activity of transmembrane proteins induces magnification of shape fluctuations of lipid membranes. *Physical Review Letters*, *82*(21), 4356.

Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T. (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *The EMBO journal*, *25*(15), 3446–3457.

Martin, D. S., Forstner, M. B., & Käs, J. A. (2002). Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking. *Biophysical Journal*, *83*(4), 2109–2117.

Mascalchi, P., Haanappel, E., Carayon, K., Mazères, S., & Salomé, L. (2012). Probing the influence of the particle in Single Particle Tracking measurements of lipid diffusion. *Soft Matter*, *8*(16), 4462–4470.

Mathivet, L., Cribier, S., & Devaux, P. F. (1996). Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical Journal*, *70*(3), 1112–1121.

Méléard, P., Bagatolli, L. A., & Pott, T. (2009). Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions. In B.-M. in Enzymology (Ed.), (Vol. 465, pp. 161–176). Academic Press.

Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., & Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, *397*(6714), 50.

Metzler, R., Jeon, J.-H., & Cherstvy, A. G. (2016). Non-Brownian diffusion in lipid membranes: Experiments and simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1858*(10), 2451–2467.

Michael Jansen. (1994). Untersuchungen der Wasserpermeation durch Lipidmembranen. Universität Kaiserlautern,.

Michalet, X. (2010). Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Physical Review E*, *82*(4), 041914.

Michel, H., & Oesterhelt, D. (1980). Three-dimensional crystals of membrane proteins: bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(3), 1283–1285.

Morales-Penningston, N. F., Wu, J., Farkas, E. R., Goh, S. L., Konyakhina, T. M., Zheng, J. Y., et al. (2010). GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1798*(7), 1324–1332.

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R. S., Ike, H., Yuasa, S., et al. (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *Journal of Cell Biology*, *174*(6), 851–862.

Morris, R. G., & Turner, M. S. (2015). Mobility measurements probe conformational changes in membrane proteins due to tension. *Physical Review Letters*, *115*(19), 198101.

Naji, A., Atzberger, P. J., & Brown, F. L. (2009). Hybrid elastic and discrete-particle approach to biomembrane dynamics with application to the mobility of curved integral membrane proteins. *Physical Review Letters*, *102*(13), 138102.

Naji, A., Levine, A. J., & Pincus, P. A. (2007). Corrections to the Saffman-Delbrück mobility for membrane bound proteins. *Biophysical journal*, *93*(11), L49–L51.

Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., et al. (2016). A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science*, *354*(6319), 1552–1557.

Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., & Landau, E. M. (2002). Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1565*(2), 144–167.

Nirasay, S., Badia, A., Leclair, G., Claverie, J. P., & Marcotte, I. (2012). Polydopamine-Supported Lipid Bilayers. *Materials*, *5*(12), 2621–2636. doi:10.3390/ma5122621

Nirmal, M., Dabbousi, B. O., Bawendi, M. G., Macklin, J. J., & others. (1996). Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, *383*(6603), 802.

Oesterhelt, D., & Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nature*, *233*(39), 149–152.

Oesterhelt, D., & Stoeckenius, W. (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(10), 2853–2857.

Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., & Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal*, *79*(1), 321–327.

Ott, M., Shai, Y., & Haran, G. (2013). Single-particle tracking reveals switching of the HIV fusion peptide between two diffusive modes in membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *117*(42), 13308–13321.

Owen, D. M., Williamson, D., Rentero, C., & Gaus, K. (2009). Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation. *Traffic*, *10*(8), 962–971.

Pan, J., Mills, T. T., Tristram-Nagle, S., & Nagle, J. F. (2008). Cholesterol perturbs lipid bilayers nonuniversally. *Physical Review Letters*, *100*(19), 198103.

Pan, J., Tristram-Nagle, S., & Nagle, J. F. (2009). Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Physical Review Letters*, *80*(2), 021931.

Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., & Landau, E. M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science*, *277*(5332), 1676–1681.

Perrin, J. (1909). Mouvement brownien et réalité moléculaire. In *Annales de Chimie et de Physique* (Vol. 18, pp. 5–104).

Peters, R., & Cherry, R. J. (1982). Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrück equations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(14), 4317–4321.

Petrášek, Z., Ries, J., & Schwille, P. (2010). Scanning FCS for the characterization of protein dynamics in live cells. *Methods in enzymology*, *472*, 317–343.

Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., & Sens, P. (2009). Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, *459*(7245), 379–385.

Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A., & Dahan, M. (2010). Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nature methods*, *7*(4), 275–285.

Pincet, F., Adrien, V., Yang, R., Delacotte, J., Rothman, J. E., Urbach, W., & Tareste, D. (2016). FRAP to Characterize Molecular Diffusion and Interaction in Various Membrane Environments. *PLoS One*, *11*(7), e0158457.

Przybylo, M., Sỳkora, J., Humpolíčková, J., Benda, A., Zan, A., & Hof, M. (2006). Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir*, *22*(22), 9096–9099.

Quemeneur, F., Sigurdsson, J. K., Renner, M., Atzberger, P. J., Bassereau, P., & Lacoste, D. (2014). Shape matters in protein mobility within membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(14), 5083–5087.

Ramadurai, S., Holt, A., Krasnikov, V., van den Bogaart, G., Killian, J. A., & Poolman, B. (2009). Lateral diffusion of membrane proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(35), 12650–12656.

Rasmussen, T. E., Liselotte, J., Jonathan, B., Stefan, V., Esben R, T., B Christoffer, L., et al. (2013). Single molecule applications of quantum dots. *Journal of Modern Physics*, *2013*.

Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., & Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical Journal*, *79*(1), 328–339.

Rawicz, W., Smith, B. A., McIntosh, T. J., Simon, S. A., & Evans, E. (2008). Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids. *Biophysical Journal*, *94*(12), 4725–4736.

Rayan, G., Guet, J.-E., Taulier, N., Pincet, F., & Urbach, W. (2010). Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors*, *10*(6), 5927–5948.

Reister, E., & Seifert, U. (2005). Lateral diffusion of a protein on a fluctuating membrane. *Europhysics Letters*, *71*(5), 859.

Reister-Gottfried, E., Leitenberger, S. M., & Seifert, U. (2007). Hybrid simulations of lateral diffusion in fluctuating membranes. *Physical Review E*, *75*(1), 011908.

Reynwar, B. J., & Deserno, M. (2008). Membrane composition-mediated protein-protein interactions. *Biointerphases*, *3*(2), FA117–FA124.

Reynwar, B. J., Illya, G., Harmandaris, V. A., Müller, M. M., Kremer, K., & Deserno, M. (2007). Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature*, *447*(7143), 461–464.

Ries, J., & Schwille, P. (2008). New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *10*(24), 3487–3497.

Rigaud, J.-L., & Lévy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods in Enzymology*, *372*, 65–86.

Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., & Lambert, O. (1998). Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *European Biophysics Journal*, *27*(4), 305–319.

Rigaud, J.-L., Pitard, B., & Levy, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1231*(3), 223–246.

Rodriguez-Boulan, E., & Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*, *245*(4919), 718–725.

Roger, H., & George G, L. (1980). *Biological Membranes: Their Structure and Function.* New York: Wiley.

Sackmann, E. (1994). Membrane bending energy concept of vesicle-and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*, *346*(1), 3–16.

Saffman, P. G. (1976). Brownian motion in thin sheets of viscous fluid. *Journal of Fluid Mechanics*, *73*(4), 593–602.

Saffman, P. G., & Delbrück, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(8), 3111–3113.

Sako, Y., & Kusumi, A. (1994). Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *The Journal of Cell Biology*, *125*(6), 1251–1264.

Salomé, L., Lenne, P.-F., & Destainville, N. (2006). Membranes biologiques: vers un modèle physique. *Images de la physique*, 74–79.

Sankaram, M. B., & Thompson, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, *29*(47), 10670–10675.

Saxton, M. J. (1987). Lateral diffusion in an archipelago. The effect of mobile obstacles. *Biophysical Journal*, *52*(6), 989–997.

Saxton, M. J., & Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, *26*(1), 373–399.

Scherfeld, D., Kahya, N., & Schwille, P. (2003). Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. *Biophysical Journal*, *85*(6), 3758–3768.

Seki, K., Ramachandran, S., & Komura, S. (2011). Diffusion coefficient of an inclusion in a liquid membrane supported by a solvent of arbitrary thickness. *Physical Review E*, *84*(2), 021905.

Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H., & Marguet, D. (2008). Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nature Methods*, *5*(8), 687–694.

Sevcsik, E., Brameshuber, M., Fölser, M., Weghuber, J., Honigmann, A., & Schütz, G. J. (2015). GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. *Nature Communications*, *6 : 6969*.

Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigmann, A., et al. (2012). Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1818*(7), 1777–1784.

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H., & Ando, T. (2010). High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nature Nanotechnology*, *5*(3), 208–212.

Simeonov, P., Werner, S., Haupt, C., Tanabe, M., & Bacia, K. (2013). Membrane protein reconstitution into liposomes guided by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, *184*, 37–43.

Simons, K., & Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(10), 688–699.

Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, *387*(6633), 569.

Simons, K., & Van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, *27*(17), 6197–6202.

Simons, K., & Vaz, W. L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual. Review. Biophysical. Biomolecular Structure*, *33*, 269–295.

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Membranes and Viruses in Immunopathology Eds*, 7–47.

Smith, R. L., & Oldfield, E. (1984). Dynamic structure of membranes by deuterium NMR. *Science*, *225*, 280–289.

Sonnleitner, A., Schütz, G. J., & Schmidt, T. (1999). Free Brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophysical Journal*, *77*(5), 2638–2642.

Stoeckenius, W., & Rowen, R. (1967). A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. *The Journal of Cell Biology*, *34*(1), 365–393.

Stone, H. A., & Ajdari, A. (1998). Hydrodynamics of particles embedded in a flat surfactant layer overlying a subphase of finite depth. *Journal of Fluid Mechanics*, *369*, 151–173.

Streicher, P. (2008, November 28). *Studying Integrin-Mediated Cell Spreading Using a Biomimetic System*. Thèse de Doctorat-Université Pierre et Marie Curie.

Stryer. (1997). *La Biochimie* (4ème édition.). Flammarion.

Subramaniam, S. (1999). The structure of bacteriorhodopsin: an emerging consensus. *Current Opinion in Structural Biology*, *9*(4), 462–468.

Subramaniam, S., & Henderson, R. (2000). Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature*, *406*(6796), 653.

Sun, Y. (2010). *Confinement and adsorption of end-grafted lambda-phage DNAs under bio-adhesive membranes*. Thèse de Doctorat-Université de Strasbourg.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., et al. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846.

Tank, D. W., Wu, E. S., Meers, P. R., & Webb, W. W. (1982). Lateral diffusion of gramicidin C in phospholipid multibilayers. Effects of cholesterol and high gramicidin concentration. *Biophysical Journal*, *40*(2), 129–135.

Tristram-Nagle, S., Petrache, H. I., & Nagle, J. F. (1998). Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, *75*(2), 917–925.

Umemura, Y. M., Vrljic, M., Nishimura, S. Y., Fujiwara, T. K., Suzuki, K. G., & Kusumi, A. (2008). Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking. *Biophysical Journal*, *95*(1), 435–450.

Unwin, P. N. T., & Henderson, R. (1975). Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *Journal of Molecular Biology*, *94*(3).

Van Den Bogaart, G., Hermans, N., Krasnikov, V., de Vries, A. H., & Poolman, B. (2007). On the decrease in lateral mobility of phospholipids by sugars. *Biophysical Journal*, *92*(5), 1598–1605.

van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annual Review of Cell Biology*, *5*(1), 247–275.

van Meer, G., & de Kroon, A. I. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, *124*(1), 5–8.

Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*(2), 112.

Vaz, W. L., & Dieter, H. (1983). Experimental evidence against the applicability of the Saffman-Delbrück model to the translational diffusion of lipids in phosphatidylcholine bilayer membranes. *FEBS Letters*, *152*(2), 287–290.

Vereb, G., Szöll\Hosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., et al. (2003). Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8053–8058.

Vonck, J. (2000). Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography. *The EMBO Journal*, *19*(10), 2152–2160.

Weinberger, A., Tsai, F.-C., Koenderink, G. H., Schmidt, T. F., Itri, R., Meier, W., et al. (2013). Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, *105*(1), 154–164.

Weitz, S., & Destainville, N. (2013). Attractive asymmetric inclusions in elastic membranes under tension: cluster phases and membrane invaginations, *9*(32), 7804–7816.

Weiβ, K., Neef, A., Van, Q., Kramer, S., Gregor, I., & Enderlein, J. (2013). Quantifying the diffusion of membrane proteins and peptides in black lipid membranes with 2-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, *105*(2), 455–462.

Welling, G. W., Nijmeijer, J. R., Groen, G., Wilterdink, J. B., Welling-Wester, S., & others. (1984). Isolation of detergent-extracted Sendai virus proteins by gel-filtration, ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography and the effect on immunological activity. *Journal of Chromatography A*, *297*, 101–109.

Wiener, C. (1863). *Ann. d. Physik 118* (Vol. 118).

Wieser, S., & Schütz, G. J. (2008). Tracking single molecules in the live cell plasma membrane—do's and don't's. *Methods*, *46*(2), 131–140.

Wong, W., & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(12), 959.

Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., et al. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, *21*(1), 41–46.

Yguerabide, J., Schmidt, J. A., & Yguerabide, E. E. (1982). Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, *40*(1), 69–75.

Yolcu, C., & Deserno, M. (2012). Membrane-mediated interactions between rigid inclusions: an effective field theory. *Physical Review E*, *86*(3), 031906.

Zampighi, G. A., Hall, J. E., Ehring, G. R., & Simon, S. A. (1989). The structural organization and protein composition of lens fiber junctions. *Journal of Cell Biology*, *108*, 2255–2275.

Annexes

Annexe 1: Abréviations

AFM: Microscopie de Force Atomique

BR: Bactériorhodopsine

Chol: Cholesterol

C8-BODIPY500/510 C5-HPC: 4,4-difluoro-5-octyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoic acid

DiD: DiIC18(5) (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine, 4-Chlorobenzenesulfonate Salt)

Dil Stain : (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiIC18(3)))

DiO : DiOC18(3) (3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorate)

DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DMPC: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

EPC/EPA: Egg L-α- phosphatidylcholine (EPC), Egg L-α -phosphatidic acid (EPA)

Fluorescein DHPE: N-(Fluorescein-5-Thiocarbamoyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt)

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

FCS: Fluorescence correlation spectroscopy

OG-DHPE: Oregon Green 488 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine

POPC: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

QD: Quantum Dot

QDs: Quantum Dots

SPT: Single Particle Tracking (méthode de suivi de particule unique)

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma d'une cellule animale montrant la membrane plasmique, le cytoplasme et différentes organelles au sein de la cellule : noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, peroxysomes et endosomes. 10

Figure 2 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire et de ses principaux composants: la bicouche lipidique et certaines protéines transmembranaires. (Source : Wikipédia). 10

Figure 3 : Bicouche lipidique et structure des lipides les plus communs dans les membranes cellulaires. Les charges correspondent à un pH physiologique de 7,4. Les structures proviennent de https://www.avantilipids.com 12

Figure 4 : Morphologies obtenues par auto-assemblage de molécules amphiphiles (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) et (Lipowsky and Sackmann 1995). 14

Figure 5 : Différents mécanismes permettant de former des SUVs, LUVs ou GUVs. D'après (Sun 2010) 15

Figure 6 : Différents types de protéines membranaires et leurs fonctions : (a) Les récepteurs protéiques fixent spécifiquement des messagers chimiques (hormones, neurotransmetteurs) et génèrent une cascade de signaux qui modifient le comportement de la cellule. (b) Les chaînes oligo-saccharidiques des glycoprotéines jouent un rôle important dans les processus de reconnaissance cellulaire. (c) Les protéines d'adhérence intercellulaire (par ex. les cadhérines) attachent mécaniquement les cellules à leurs voisines. (d) Les protéines enzymatiques lient un substrat sur leur site actif et catalysent sa conversion en un produit final qui inhibe souvent les enzymes qui l'ont initié. (e) Les protéines de transport (canaux ou pompes) permettent à des solutés de traverser la membrane. (f) D'autres protéines d'adhésion (intégrines) permettent aux cellules de s'accrocher à la matrice extracellulaire. (Cette image a été prise dans la thèse de (Girard 2004)) 16

Figure 7 : Différents types d'ancrage d'une protéine membranaire avec la bicouche lipidique. (1,2) Ancrage transmembranaire par une hélice (1) ou plusieurs (2) hélices alpha hydrophobes. (3) Ancrage transmembranaire par un tonneau β. (4) Protéines ancrées à la surface par une hélice alpha amphipathique ou (5,6) par un ancrage lipidique. (7,8) Protéines attachées à la bicouche seulement par des interactions non covalentes avec d'autre protéines membranaires (Alberts et al. 2002, p. 594) 16

Figure 8 : Tonneaux β formés à partir de différents brins β. (1) Protéine OmpA de *E. coli* (8 brins β) jouant le rôle de récepteur pour un virus bactérien. (2) Protéine OMPLA de *E. coli* (12 brins β) est une enzyme qui hydrolyse les lipides. L'acide aminé qui catalyse la réaction enzymatique est montrée par le point rouge. (3) Protéine de porine qui forme un canal aqueux dans la membrane (16 brins β). Le diamètre du canal est réduit par la boucle représentée en bleue. (4) Protéine FepA de *E. coli* (22 brins β) qui transporte les ions de fer (Alberts et al. 2002, p. 594). 17

Figure 9 : (A) Transporteurs de solutés d'un côté de la membrane à l'autre. (B) Canal ionique. (Alberts et al. 2002, p. 594).....18

Figure 10 : Processus de transport passif (dans le sens de gradient de concentration) et actif (contre le gradient de concentration) (Alberts et al. 2002, p. 594).....18

Figure 11: Structure schématique du centre réactionnel photosynthétique de la bactérie *Rhodopseudomonas viridis* (Alberts et al. 2002, p. 594).....19

Figure 12 : Fractions massiques relatives en protéines, lipides et glucides de diverses membranes (Alberts et al. 2002).....19

Figure 13 : Les vésicules synaptiques (A) sont très largement constituées de protéines (Takamori et al. 2006). La membrane des globules rouges (B) est composée par de nombreuses protéines (petit point blanc) à l'intérieur de la membrane (Stryer 1997). 20

Figure 14 : Modèles généraux de membrane. A-Modèle initial de Singer et Nicolson : Peu de protéines (en vert) dans la membrane (Singer and Nicolson 1972). B- Modèle de Singer et Nicolson revisité pour tenir compte de l'encombrement des protéines dans la membrane (Engelman 2005).....20

Figure 15 : Au-dessus de la température de fusion des chaînes acyles (Tc), une membrane lipidique passe d'une phase gel $P_{\beta'}$ (ou cristalline rigide) où les chaînes d'acides gras ont de fortes interactions hydrophobes, à une phase fluide moins ordonnée Lα où les chaînes d'acides gras sont plus mobiles. Cette phase fluide est caractérisée par des comportements dynamiques au sein de la bicouche, qui sont à l'échelle microscopique les diffusions latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou flip-flop) avec des échelles de temps caractéristiques totalement différentes (Figure de (Lipowsky and Sackmann 1995)).....22

Figure 16 : Diagramme de composition de phase du système DPPC-Cholestérol en fonction de la température. $S_0 = s_0$ (solide), $L_d = l_d$ (liquid désordonné), $L_o = l_o$ (liquid ordonné) (D. A. Brown and London 1998).....23

Figure 17 : Visualisation de la séparation de phase pour de vésicules géantes de composition ternaire DOPC-Cholestérol-SM. La phase liquide ordonné (L_o) est marquée en bleu, la phase liquide désordonnée (L_d) est marquée en rouge (Baumgart et al. 2003). 24

Figure 18 : Diagramme de phase ternaire DOPC-Cholestérol-SM construit à partir des mesures de leur coefficient de diffusion par FCS. Les points noirs correspondent à des compositions homogènes fluides, les points en briques à des phases gel pures, et les autres à des coexistences de phases. Les nombres au-dessus de chaque point correspondent au coefficient de diffusion en $\mu m^2.s^{-1}$ (Kahya et al. 2003).....24

Figure 19 : Image confocale des GUVs et GPMVs formées à partir de cellules RBL-2H3C (imagées à 10°C), marquées par des analogues lipidiques fluorescents, BD-FL-C12 SM (en vert) et DiD (en rouge, connu comme marqueur de phase désordonnée L_d). 25

Figure 20 : Hiérarchie de l'hétérogénéité des radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires. (A) Domaines nanométriques de stérols et de sphingolipides. Les protéines à ancre GPI, des protéines trans-membranaires, des effecteurs cytosoliques acylés et l'actine corticale peuvent participer et moduler ces assemblages. (B) La liaison de ligands, la multimérisation de protéines induisent la coalescence des nanodomaines, formant ainsi des plateformes pour la signalisation et le trafic intracellulaire. (C) Formation de macro-domaines dans un système à l'équilibre (GPMV, PMS), (Lingwood and Simons 2010). 26

Figure 21 : Hétérogénéité latérale de la membrane plasmique : La membrane est constituée de domaines de radeaux lipidiques distincts et de zones dépourvues de domaines (Sezgin et al. 2017). 26

Figure 22 : Modèle de « barrières et piquets » de la face interne de la membrane. Le cytosquelette (orange) constitue des mailles de quelques centaines de nm qui bloquent partiellement les protéines membranaires (bleu, marron, vert). D'après (Fujiwara et al. 2002).....27

Figure 23 : Une autre représentation du modèle de « barrières et piquets » (A) Barrières de squelette membranaire (Membrane skeleton (MSK) en anglais) (jaune). (B) Protéines ancrées au cytosquelette sous forme de "piquet" affectant la diffusion des protéines (Kusumi et al. 2012). 28

Figure 24 : Simulation d'un modèle de « particules browniennes en interaction». Les interactions attractives entre protéines membranaires (en rouge) conduisent à l'existence d'assemblées de protéines causant leur confinement (Salomé et al. 2006) 29

Figure 25 : Coefficients de perméabilité de différentes molécules à travers la bicouche lipidique en phase fluide d'après (Stryer 1997).....30

Figure 26 : Les trois modes de déformation possibles des membranes: a) mode de compression-extension induisant un changement d'aire, b) mode de cisaillement induisant une extension latérale à une aire constante, et c) mode de courbure (E. Evans and Rawicz 1990). 30

Figure 27 : Image d'une GUV obtenue en microscope optique (a) Vésicule peu tendue : les fluctuations de membranes sont optiquement visibles. (b) Vésicule tendue : pas de fluctuation détectable optiquement (c) Représentation schématique d'une membrane "froissée". A représente l'aire réelle de la vésicule et A_P représente l'aire projetée de la vésicule. Cette image a été prise dans la thèse de (Streicher 2008, p. p 38) 33

Figure 28 : Mouvement du centre de gravité d'une particule de pollen en suspension révélant le mouvement brownien (Duplantier 2005) 34

Figure 29 : Modèle de la mosaïque fluide : les protéines membranaires isolées diffusent librement dans la bicouche lipidique (d'après (Singer and Nicolson 1972)).....36

Figure 30: Modèle de Saffman and Delbruck (SD) pour la diffusion d'inclusions membranaires. Les protéines membranaires isolées de forme cylindrique diffusent librement dans la bicouche lipidique entourée d'une phase aqueuse de chaque côté. La protéine peut se déplacer latéralement dans le plan (x,y) et tourner autour de l'axe z (Saffman and Delbrück 1975).....37

Figure 31 : Différents types de restriction des protéines dans la membrane plasmique (vue de la face cytoplasmique). A) Affinité des protéines pour les micro-domaines lipidiques. Ces protéines sont confinées dans les micro domaines si l'énergie d'activation pour passer la barrière du domaine est supérieure à l'énergie cinétique des protéines. B) Les protéines dont les domaines intracellulaires sont longs sont incapables de traverser la barrière constituée des filaments du cytosquelette. C) Celles avec de courts domaines intracellulaires traversent la barrière. D) Clusters de protéines avec une diffusion réduite par rapport aux protéines monomériques (Vereb et al. 2003). 39

Figure 32: (A) Vue latérale de la membrane avec une protéine intégrale (gris foncé), qui crée une déformation (bosse) générant des flux supplémentaires dans le solvant (flèches solides), ce qui entraîne une dissipation supplémentaire dans la membrane. (B) Vue

de dessus de la membrane montrant la protéine (gris foncé) et la membrane perturbée qui l'entoure (partie grisée hachurée) (d'après (Naji et al. 2007)). 42

Figure 33 : Forme membranaire en fonction de la tension. (A) Profil calculé à partir de l'hamiltonien d'Helfrich modifié, avec $\Theta = 3.5 \times 10^{-7}$ m, $\kappa = 20\ k_BT$, et $a = 4$ nm (lignes solides). Profil calculé numériquement en minimisant l'énergie (ligne pointillée). (B) Profils tridimensionnel de membrane obtenus à partir de simulations numériques pour trois tensions différentes (d'après (Quemeneur et al. 2014)). 43

Figure 34 : Mobilité latérale des protéines dans les membranes fluctuantes. Tracé semi logarithmique des coefficients de diffusion (D_{eff}) en fonction de la tension de la membrane Σ, pour AQP0 (◆) et KvAP (▲). Les données KvAP ajustées par l'équation (20) (ligne continue) donne un coefficient de couplage protéique $\Theta = 3.5 \times 10^{-7}$ m, considérant $a = 5$ nm, $\kappa = 20\ k_BT$ et $D_0 = 2.5\ \mu m^2.s^{-1}$. Des simulations de la diffusion de protéines sur une membrane soumise à des fluctuations thermiques (■) correspondent bien aux données expérimentales et à la théorie. (Inserts) Schémas de déformation de la membrane due à la présence des protéines (Quemeneur et al. 2014). 44

Figure 35 : Simulation MARTINI de bicouches contenant le canal NaK dans deux types de bicouches: DPPC (colonne de gauche) et DLPC (colonne de droite), pour deux rapports molaires protéines:lipides 1: 50 (haut) et 1: 100 (bas). Les protéines sont colorées en jaune et les lipides en brun (Javanainen et al. 2013). 46

Figure 36 : Coefficient de diffusion des lipides (gauche) et des protéines NaK (droite) dans une bicouche de DPPC (rouge) et de DLPC (bleu) en fonction du rapport molaire protéines:lipides (Javanainen et al. 2013) 47

Figure 37 : Effet d'obstacles fixes sur la diffusion membranaire obtenu par simulation de Monte Carlo sur un réseau de maille carrée. Déplacements quadratiques moyens ($r2$) en fonction du temps pour différentes concentrations d'obstacles c. (A) correspond au cas où $c < c_p$, la concentration seuil de percolation ($c_p = 0.41$ pour ce type de réseau) (B) correspond au cas où $c \geq c_p$, et où le mouvement est confiné (Saxton 1987). 47

Figure 38 : Effet d'obstacles mobiles sur le coefficient de diffusion relatif D*. Coefficient de diffusion en fonction de la fraction de surface c et du taux de saut relatif γ. $\gamma=\infty$ correspond aux obstacles fixes et $\gamma=1$ au cas où obstacles et traceurs ont les mêmes mobilités. 48

Figure 39 : Coefficient de diffusion relatif D^* en fonction de la fraction de surface c des traceurs pour les points (R = 0, correspondant aux lipides) et les hexagones de rayon R = 1-16 (les protéines) sur un réseau triangulaire. Ligne pointillée : courbe théorique pour R = 0 à partir des équations (4-6 dans (Saxton 1987). Ajustement des moindres carrés (ligne pleine) pour R = 1-4 à partir de l'équation (26) (Saxton 1987). 49

Figure 40 : (A) Diffusion de lipides dans la membrane à base de DMPC où la bacteriorhodopsine (BR) a été reconstituée, en fonction de la fraction surfacique en protéines (Φ). Φ = 0 et 20% (cercles non remplis et remplis) ; Φ = 33% (triangle non rempli) ; Φ = 54% (triangle rempli). (B) Diffusion de la BR en fonction de la densité en protéine (Φ). Φ = 14 % (cercles non remplis) ; Φ = 20% (cercle rempli); Φ = 28% (triangle non rempli); Φ = 54% (triangle rempli) (Peters and Cherry 1982). 50

Figure 41 : Mesure par FCS du coefficient de diffusion (*D*) des lipides et des protéines en fonction de la densité en protéines (le transporteur du glutamate trimérique, GltT,

carrés pleins ; le transporteur de lactose dimérique, LacS, cercles pleins ; la lactose perméase monomère, LacY, triangles pleins. Les lipides correspondent aux symboles vides. (Ramadurai et al. 2009). 51

Figure 42 : Principes du FRAP et de la FCS. Ces deux méthodes utilisent un laser pour éclairer une petite région de la membrane (en vert) et collectent la fluorescence de molécules marquées (en rouge) à l'aide d'un montage confocal. D'après (Marguet et al. 2006).....54

Figure 43 : (A) Le schéma de principe du « suivi de molécule unique ». La particule ou molécule (ici un colloïde d'or) est greffée à la protéine ou au lipide d'intérêt par l'intermédiaire d'un anticorps, en bleu ; (B) en haut, une trajectoire acquise par détection de position en vidéo microscopie (pendant 2 mn), en bas le déplacement quadratique moyen (MSD) de la position en fonction du temps, calculé à partir de cette trajectoire. A une diffusion lente aux temps longs se superpose une diffusion rapide et confinée aux temps courts. D'après (Salomé et al. 2006) 55

Figure 44 : Carte de densité de diffraction montrant la structure bidimensionnelle cristalline hexagonale de la membrane pourpre avec une résolution de 0.7 nm. Les protéines s'organisent dans un plan avec une symétrie d'ordre trois (petits triangles). Les lignes pleines foncées correspondent aux dimensions de la maille unitaire (6.2 nm x 6.2 nm). On voit un trimère de BR par maille élémentaire du réseau (Unwin and Henderson 1975).....58

Figure 45 : Spectre d'absorption de la BR. Cette image a été prise dans la thèse de Jean-Baptiste Manneville (Jean-Baptiste Manneville 1999).....58

Figure 46 : Structure secondaire de la BR (le rétinal n'est pas montré). Les différents acides aminés sur fond en couleur et numérotés sont ceux qui ont un rôle particulier et ont donné lieu à une mutation génétique. Les lettres A à G sont les 7 hélices alpha. Le coté cytoplasmique de la protéine est situé vers le dessus de la figure et l'extérieur de la cellule vers le dessous. (d'après (Khorana 1988)).....59

Figure 47 : Structure tridimensionnelle de la BR. Les 7 hélices alpha sont représentées en orange et le rétinal en rose au centre. Les flèches représentent les étapes de translocation de proton (Luecke et al. 1999).....60

Figure 48 : Formule de deux isomères all-trans et 13-cis du rétinal (d'après (Neutze et al. 2002)).....61

Figure 49 : Représentation du cycle photochimique de la BR. A- Modèle proposé par Losier et al. (1975) (d'après (R. Henderson et al. 1990)). Le cycle est amorcé par l'absorption de la lumière par BR_{570}. Un proton est éjecté à l'extérieur de la cellule et un autre entre dans le cytoplasme aux étapes indiquées en pointillées. B-Modèle récent plus détaillé du cycle photochimique de la BR montrant les intermédiaires spectraux, leur maximum d'absorption, et leurs durées de vie à température ambiante (Neutze et al. 2002).....61

Figure 50 : Représentation schématique des étapes de transfert de protons dans le photocycle de la BR. L'image de gauche montre les 7 hélices alphas A à G. et les résidus stratégiques qui participent au transfert de protons (Asp96, Asp85, Arg82, Glu194, Glu204), ainsi que le rétinal lié à Lys216 dans l'hélice G sont mis en évidence (Nango et al. 2016) (Neutze et al. 2002). L'image de droite également montre les 7 hélices alpha mais cette fois-ci reliées par de courtes boucles à l'état fondamental (a). Quand la BR est excitée, elle change de structure et l'hélice C se déplace pour faciliter le transport de proton. Les résidus qui participent au transfert de protons (Asp96, Asp85, Arg82), ainsi que le rétinal lié à Lys216 dans l'hélice G sont mis en

évidence à l'état L (b) (Kühlbrandt 2000). (c) Etat M : Le rétinal déprotoné change de couleur, il passe du rose au jaune et l'atome d'azote à l'intérieur de la cellule. Les hélices F et G aussi se déplacent. (d) Etat N : translocation du proton à l'extérieur de la cellule via les résidus Glu194, Glu204 et des molécules d'eau. Les hélices F et G se déplacent en sens inverse de (c) puis retourne à l'état fondamental (a) et le cycle recommence. 63

Figure 51: Réaction de la molécule de Sulfo-NHS-LC-Biotin avec une amine primaire (d'après https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21435). 65

Figure 52 : Représentation schématique des étapes de reconstitution d'une protéine membranaire en petits liposomes. Avec la membrane pourpre, nous n'avons pas à réaliser l'étape de purification puisqu'elle ne contient pas d'autres protéines membranaires que la BR. Ici, nous avons utilisé des Biobeads (polystyrene beads) pour retirer le détergent (d'après (Jean-Louis Rigaud and Lévy 2003)). 66

Figure 53 : Structure semi-développée de la molécule de DOPC 67

Figure 54 : Chambre d'électroformation des GUVs. La chambre est formée d'un bloc de PTFE avec trois puits traversés par deux fils de platine reliés à un générateur AC par des pinces crocodiles. 70

Figure 55 : A- Observation de GUVs pendant l'électroformation sur fil de platines. Les GUVs forment des "grappes" sur les fils, entre 20 et 30 minutes. B. GUVs obtenues entre 1h et 2h, à la fin de l'électroformation (à gauche) et celles obtenues après leur détachement (à droite). Barres d'échelle : 10 µm (adapté de (Méléard et al. 2009)) 70

Figure 56 : Schéma de l'électroformation des GUVs : Des gouttelettes contenant des protéo-SUVs sont déposées sur des fils de platine. La déshydratation partielle de la solution induit un empilement de membranes. Le tampon de réhydratation est ensuite ajouté et un champ électrique AC est appliqué. À mesure que le film gonfle, les membranes individuelles se détachent de l'empilement pour former des GUVs (d'après (Aimon 2011) et (Garten et al. 2015). 71

Figure 57 : Schéma du montage expérimental sur le microscope. L'observation du mouvement des protéines est réalisée en épifluorescence à l'aide d'une caméra ultrasensible EMCCD. Le système d'aspiration par une micropipette montée sur un micromanipulateur permet de contrôler la tension. La seconde micropipette permet l'injection des QDs dans la chambre. 72

Figure 58 : Propriétés des quantums dots. (A) Fluorescence sur toutes les longueurs d'ondes du visible (Dubertret 2004, qdots.com). (B) Particule fluorescente (QD655) conjugué à la streptavidine (d'après le protocole de biotek, www.biotek.com). (C) Clignotement d'un QD (Nirmal et al. 1996) 75

Figure 59 : Image en microscopie DIC d'une GUV de diamètre D_v et de pression P_v aspirée par une micropipette de diamètre D_p et de pression P_{int}. Le contour apparent de la langue de longueur L_p est représenté à droite. La barre correspond à 5µm. Cette image a été prise dans la thèse de P. Girard (Girard 2004). 76

Figure 60: Différents modes de diffusion des particules à temps court, correspondant à différentes valeurs de l'exposant α. Pour α =1, le régime est diffusif et la diffusion est brownienne ou normale (courbe rouge). Pour α <1, le régime est subdiffusif (jaune) et pour α > 1, on est dans un régime super-diffusif(bleue). Dans ces 2 derniers cas, la diffusion des particules est non-brownienne. D'après (Dix and Verkman 2008) 77

Figure 61 : Principe d'une expérience type. (A) Une GUV contenant ou non des BRs est aspirée par une micropipette pour maintenir sa position et contrôler sa tension. Les

protéines ou les lipides d'intérêt (tracer) sont marqués à l'aide de Qdots injectés localement sur la vésicule par l'intermédiaire d'une seconde micropipette. (B) Exemple de trajectoire de 2 QDs. Le trait orange correspond à la limite de la zone explorée par les QDs. Les trajectoires des Qdots suite au déplacement des tracers sont représentées en bleu. La taille d'un pixel est de 160 nm. (Adapté de (Quemeneur et al. 2014)). 78

Figure 62 : Représentation de la ROI (région d'intérêt) théorique utilisée pour détecter les trajectoires des QDs. C'est un carré de côté $L_{xth}=L_{yth}=c$, c étant la corde de la sphère. s est le sagitta,.fixé à 100 nm dans notre analyse. 79

Figure 63 : Critère de sélection des QDs basé sur la PSF : les QDs au focus (point rouge) ont une PSF avec une largeur de 1.7 pixel. Lorsque les Qdots sont hors focus, (point noir) la largeur de la PSF augmente, l'intensité maximale est alors diminuée (B). ..80

Figure 64 : Formation de courtes trajectoires à partir de la position des QDs à différents instants. (A) A l'instant t_0, une particule est localisée à une position. Entre les instants t_0 et t_1, la particule peut explorer un cercle bleu de rayon R_0. (B) Si à l'instant t_1 une particule se situe dans le cercle bleu de rayon R_0, alors on relie le centre de la particule à t_0 et à t_1 pour créer une trajectoire. La particule peut alors explorer un cercle rouge de rayon R_1 entre les instants t_1 et t_2. (C) Si une particule se situe dans ce cercle à l'instant t_3, sa position sera connectée aux 2 positions précédentes pour créer une trajectoire. Si entre l'instant t_0 et t_1, le QD s'éteint (D-E), alors à l'instant t_2, on regarde si la particule est localisée dans un cercle de rayon $2R_0$ (F).....81

Figure 65 : reconnections de trajectoire.....82

Figure 66 : Exemple de reconnexion de trajectoires obtenue sur les déplacements d'un seul QD explorant le bas d'une GUV. Un pixel correspond à 160 nm.....82

Figure 67 : Détection des pics d'intensité correspondant à des QDs (cercles rouges et bleu sur l'image du haut). Seul le cercle bleu est gardé pour le tracking et la trajectoire correspondante en bas. La barre d'échelle est de 4 µm. 83

Figure 68 : Diagramme de MSD. On a représenté un exemple simple d'une trajectoire de 7 pas et pour chaque valeur de tlag, le nombre d'échantillonnage de sauts qu'on aura pour le calcul du MSD. 84

Figure 69 : MSD en fonction du temps. Cet exemple illustre un cas général où le MSD n'est linéaire que dans une certaine gamme de temps. Cette image a été prise dans le document d'aide du programme MATLAB « GUVDiffusion_v1 » de Marianne Reiner non publié (sous son autorisation). 84

Figure 70 : MSD en fonction du temps, estimée à partir de multiples trajectoires explorant une région d'intérêt définie (ROI) de taille variable, sur la même GUV de rayon = 23 µm (extrait de (Quemeneur et al. 2014)). L'insert supérieur gauche illustre les différents ROIs considérées pour l'analyse de SPT: $L_x = L_y = 0.98$ µm (triangles bleus), 1.67 µm (carrés roses), 2.35 µm (triangles rouges) et 3.05 µm (cercles oranges); le cercle tronqué correspond à la limite de la zone explorée par QD dans la profondeur du champ du microscope. Les données expérimentales (symboles) sont comparées à un modèle (Eq. S10, ligne continue de (Quemeneur et al. 2014)) qui décrit une protéine diffusant librement en 2D sur un rectangle de longueur L_x et largeur L_y. Les lignes pointillées correspondent à un comportement linéaire du MSD à des temps courts, $MSD=4D_{eff}t$, et au comportement asymptotique 85

Figure 71 : MSD en fonction du temps pour 2 GUVs de DOPC, de diamètre 15 µm (rouge) et 32 µm (noire). Les lignes pointillées bleue et orange correspondent au fit à temps

courts ($MSD = 4Dt$) avec D=2.7 μm²/s pour la GUV de diamètre 15 μm (ligne pointillée bleue) et D=2.9 μm²/s pour celle de diamètre 32 μm (ligne pointillée orange). Les lignes pointillées rouges et noires représentent les valeurs asymptotiques $MSDasympt = 0.0947(Lx2 + Ly2)$ liées à l'effet de confinement dû à la taille du ROI de taille respectivement $L_x = L_y = 2.42$ μm (rouge) et Lx = Ly = 3.50 μm (noire). 86

Figure 72 : Changement de volume d'une protéo-GUVs contenant l'AQP0 lors de son aspiration. (A) GUV maintenue par une micropipette à aspiration constante. (B) La longueur de la langue change au cours du temps, indiquant une perte de volume de la GUV liée à la propriété de porine de la protéine. La barre d'échelle est de 10 μm. 88

Figure 73 : Méthodes de marquage par les QDs. Les GUVs sont maintenues sur place par une micropipette (pointillés rouge). GUV typique marquée après la méthode de centrifugation (A) et d'injection (B). La barre d'échelle est de 4 μm 89

Figure 74 : Image en épifluorescence via la caméra EMCCD Andor d'une vésicule contenant l'AQP0 marquée avec de l'Alexa 488 (marqueur vert) et avec des nanoparticules fluorescentes (QD655). La longueur d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 435 ± 40 nm et 655 ± 15 nm. La barre d'échelle est de 4 μm. 89

Figure 75 : Histogramme de densité de KvAPs dans des GUVs. Les GUVs ont été préparées en utilisant un tampon salin (5 mM KCl, 1 mM HEPES, 400 mM sucrose) et la densité des protéines est mesurée par microscopie confocale. La densité moyenne des protéines dans les GUVs (1000 ±700 protéines / μm²) est comparable mais cependant inférieure à la densité de protéines dans les SUVs (EPC: EPA) à partir desquelles elles ont été formées (1600 ± 400 protéines / μm²) (Aimon 2011). 90

Figure 76 : Histogramme de densité d'AQP0s reconstituées dans des GUVs. La densité des protéines est mesurée par fluorescence confocale quantitative. La densité moyenne des protéines dans des GUVs (1000 ±400 protéines / μm²) est comparable à la densité des protéines dans des SUVs (EPC: EPA) à partir desquels ils ont été formés (1600 ± 350 protéines / μm²) (Berthaud et al. 2016). 91

Figure 77 Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) des QDs dans une GUV constituée de DOPC (A) et de DOPC + 30% cholestérol (B) . 2 valeurs de saut ont été considérées tlag =3 (magenta), et tlag=10 (bleu). Les lignes noires sont des fits gaussiens correspondant à 94

Figure 78 : Déplacements quadratiques moyens (MSD) pour une GUV constituée de DOPC (cercles rouges), et de DOPC + 30% cholestérol (cercles bleus), en fonction du temps (en secondes) estimés à partir de multiples trajectoires. Cercles rouges : GUV de DOPC de diamètre 28.4 ± 0.32 μm et un ROI avec, Lx = Ly = 3.3 μm. Cercles bleus : GUV de DOPC + 30% cholestérol de diamètre 29.2 ± 0.32 μm et Lx = Ly =3.4 μm. Les lignes pointillées noires correspondent au fit linéaire du MSD aux temps courts, $MSD = 4Dt$ avec D = 3.04 ± 0.03 μm²/s pour DOPC et D = 1.99 ± 0.02 μm²/s pour DOPC + 30% Cholestérol.....95

Figure 79 : Schéma récapitulant l'ensemble des valeurs de coefficient de diffusion de lipides DOPC et DOPC + 30% Cholestérol. 95

Figure 80 : Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) pour des QDs liés à des lipides dans une GUV pour deux valeurs de saut considérées tlag=3 (points magentas) et tlag=10 (points bleus) (A) Sans BR (Φ=0%). (B) à forte fraction (Φ=17.5%). Les lignes noires correspondent aux fits gaussiens avec $f(x) = y0 + A2/\pi W exp - 2(X - Xc)W2$, où x_c est le centre de la gaussienne, w sa largeur, A

son l'aire et y_0 "l'offset". (A) Φ=0%, t_{lag}=3, on obtient: x_c=0.330 ± 0.002, w=0.390± 0.004 A= 398± 4 et y_0=3.32± 1.99; t_{lag}=10, on obtient: x_c=0.600 ± 0.004, w=0.730± 0.009, A=324± 4 et y_0=6.09 ± 1.67. (B) Φ = 17.5%, t_{lag}=3, on obtient x_c=0.190± 0.002, w=0.250± 0.004, A=158± 2 et y_0=3.7± 1.91; t_{lag}=10, x_c=0.330± 0.003, w=0.460± 0.008, A=146± 2 et y_0=2.49± 1.06. La taille du pixel est 160 nm. 101

Figure 81 : 2 exemples de mobilité des lipides dans des GUVs en fonction de la présence de BR: Φ=0% (points rouges) correspondant à une GUV de diamètre 28± 0.32 µm, et à un ROI Lx = Ly = 3.3 µm (mêmes données que sur la Figure 78) et Φ=17.5 % (points bleus) pour une GUV de 26.04± 0.32 µm de diamètre, et Lx = Ly =3.18 µm. Les lignes pointillées noires sont les fits linéaires du MSD,.....102

Figure 82 : Variation relative du coefficient de diffusion D des lipides en fonction de la fraction surfacique de BR (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=3.08 ± 0.15 µm^2/s (fixé) dans la membrane purement lipidique. La ligne rouge correspond au fit linéaire des données par : $DD0 = 1 - A\Phi$ avec A=2.19±0.14, $R2 = 0.96$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std. 103

Figure 83 : Variation relative du coefficient de diffusion D des lipides en fonction de la fraction surfacique de BR (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=3.08± 0.15 µm^2/s (fixé) dans la membrane purement lipidique. La ligne noire continue correspond au fit linéaire des données par : $D(\Phi)D0 = 11 + A'\Phi$ avec A'=3.21±0.27 et la ligne noire pointillée au comportement attendu $D(\Phi)D0 = 11 + 2\Phi$ en supposant que l'effet des protéines peut essentiellement être décrit par une viscosité effective. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std. 105

Figure 84 : Distributions typiques de longueur de pas (en pixel) pour des QDs liés à des protéines dans une GUV pour deux valeurs de saut considérées tlag=3 (points magentas) et tlag=10 (points bleus) (A) A faible fraction surfacique de BR (Φ=0.1%) (B) A forte fraction (Φ=17.5%). Les lignes noires correspondent aux fits gaussiens avec l'expression utilisée à la Figure 80. (A) Φ=0.1 %, t_{lag}=3, on obtient: x_c= 0.300 ± 0.002 , w=0.370 ± 0.005 , A=215 ± 3 et y_0=3.57 ± 2.07 ; t_{lag}=10, x_c=0.550± 0.004, w=0.690± 0.009, A=200± 3 et y_0=2.11± 1.07. (B) Φ = 17.5%, t_{lag}=3, on obtient x_c= 0.220± 0.002, w=0.280± 0.005, A=112± 2 et y_0=2.15± 1.29 ; tlag=10, x_c= 0.410± 0.003, w=0.500± 0.006, A=92± 1 et y_0=0.35± 0.51. La taille du pixel est 160 nm 106

Figure 85 : 2 exemples de mobilité des protéines dans des GUVs contenant de la BR. MSD (à temps courts) en fonction du temps pour 2 densités de BR: Φ=0.1% (points rouges correspondant à une GUV de diamètre 31.81± 0.32 µm, et à un ROI Lx =Ly=3.18 µm et Φ=17.5 % (points bleus) pour une GUV de 24.37± 0.32 µm de diamètre, et Lx=Ly=3.10 µm. Les lignes pointillées noires sont les fits linéaires du MSD, $MSD = 4Dt$ avec D=2.73 ± 0.02 µm^2/s pour Φ=0.1% et D=1.24 ± 0.03 µm^2/s pour Φ=17.5%. 107

Figure 86 : Variation relative du coefficient de diffusion D de la BR en fonction de sa fraction surfacique (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=2.88 ± 0.12 µm^2/s (fixé) correspondant à Φ=0.1%. La ligne verte correspond au fit linéaire des données par $D(\Phi)D0 = 1 - A\Phi$ avec A=2.74±0.15, $R2 = 0.94$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std. 109

Figure 87 : Variation relative du coefficient de diffusion D de la BR en fonction de sa fraction surfacique (Φ), normalisé par le coefficient de diffusion D_0=2.88 ± 0.12 µm^2/s (fixé) correspondant à Φ = 0.1%. La ligne verte correspond au fit linéaire des

données par D(Φ)D0 = 11 + A′Φ avec $A' = 4.13 \pm 0.59$, $R2 = 0.86$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts quadratiques moyens std. 109

Figure 88 : Variation relative du coefficient de diffusion D/D_0 en fonction de la fraction surfacique des protéines (Φ). On observe deux régimes délimités par les pointillés rouges. Pour Φ < 10% (pointillés rouges), la courbe suit à peu près une loi linéaire en 1-2 Φ (pointillés noirs) et s'en écarte au-delà. 110

Figure 89 : Image de microscopie électronique par cryo-fracture de protéoliposomes pour différentes densités de Bactériorhodopsine (les fractions surfaciques Φ sont indiquées en rouges sur les images). A, B, C, D, E et F correspondent respectivement à des rapports lipides sur protéine (LP p/p) de 80, 40, 20, 10, 5 et 1 (G) Distribution de taille des particules de BR en fonction du rapport lipide / protéine (L/P en p/p) à partir de ces images. Les valeurs en rouge correspondent aux fractions surfaciques Φ. Le pic à faible diamètre correspond aux monomères de BR et celui de plus grande taille aux trimères (Gulik-Krzywicki et al. 1987). 111

Figure 90 : Simulations de Monte-Carlo: agrégats de particules pour Φ = 0.1 (N = 200 protéines, la taille de la boîte a=0.25 μm). Les clusters diffusent lentement et apparaissent non rigides, déformables et fluctuants (Destainville 2008).....112

Figure 91 : Distributions de taille des clusters pour trois concentrations différentes Φ = 0.0031 (noir), Φ = 0.0125 (Rouge), Φ = 0.05 (Gris clair). Pour Φ = 0.0031, les clusters ne sont pas visibles à l'échelle étudiée parce qu'ils sont très rares (Destainville 2008). 113

Figure 92 : Coefficient de diffusion D(Φ)D0 (Losanges noirs) et l'inverse de la taille moyenne des clusters 1/n Cercles rouges) en fonction de l'inverse de la densité des protéines 1/ Φ (en coordonnées log-log (Destainville 2008). 113

Figure 93 : Réduction du coefficient de diffusion D/D_0 en fonction de Φ. Pour Φ < 10.2% (ligne rouge) confirmation avec la théorie (1-A Φ, avec A=1.99 ± 0.04). Au-delà de 10.2% les protéines sont sous la formes de trimères et suivent une loi linéaire simple de la forme1 − 2Φ23ΦcΦ + 13, avec Φ_c=10.2%. 114

Figure 94: Variation de la diffusion des lipides D* ($D* = Dc/D0$) en fonction de la fraction surfacique de protéines c (c= Φ ici) pour différentes valeurs de γ, le rapport des mobilités des lipides et des protéines. γ=∞ correspond à des obstacles fixes et γ=1 au cas où les protéines diffusent comme les lipides (Saxton 1987). 116

Table des tableaux

Tableau 1 : Valeurs des trois modules élastiques χ, μ et κ pour différents matériaux d'après (Sackmann 1994). 32

Tableau 2 : Structure comparée des lipides avec une tête PC, utilisés dans le Tableau 3 96

Tableau 3 : Valeurs publiées des coefficients de diffusion mesurés avec différentes méthodes et avec différents modes de préparation des bicouches. Les références sont indiquées dans le tableau. 97

Tableau 4 : Tableau montrant la diminution relative du coefficient du coefficient de diffusion D avec le cholestérol, mesurée par FCS ou FRAP. 99

Tableau 5 : Tableau des valeurs du coefficient de diffusion D du DOPC en fonction de la fraction surfacique (Φ) correspondant à différents rapports massiques lipide sur protéine [LP (p/p)] et molaires [LP (mol/mol)]. D_0 est le coefficient de diffusion des lipides à Φ=0%. 103

Tableau 6 : Coefficients de diffusion D de la BR en fonction de la fraction surfacique (Φ), correspondant à différents rapports massiques lipide sur protéine [LP (p/p)] et molaires [LP (mol/mol)]. D_0 est le coefficient de diffusion de la BR à Φ=0.1% ...108

Résumé:

La diffusion latérale des lipides et des protéines transmembranaires est essentielle pour les fonctions biologiques. Dans le contexte cellulaire, la fraction surfacique des protéines membranaires est élevée, atteignant environ de 50 à 70% selon le type de membrane. La diffusion se fait donc dans un milieu très encombré. Le but de ce travail est d'étudier in vitro l'effet de l'encombrement des protéines sur la diffusion des protéines et des lipides. Jusqu'à présent, les mesures de diffusion latérale ont généralement été réalisées à faible densité de protéines, et l'effet de l'encombrement des inclusions membranaires ou des protéines membranaires a été peu étudié expérimentalement. Nous avons utilisé une méthode de suivi de particules uniques (SPT) pour suivre les trajectoires de la pompe à protons Bactériorhodopsine (BR) et de lipides marqués avec des quantum dots au bas de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) en fonction de la fraction de surface totale (Φ) de BR reconstituée dans la membrane constituée par ailleurs de 1,2-Dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC). Nous avons ainsi observé 2 régimes pour la diffusion de la BR : un régime à basse densité où le coefficient de diffusion relatif $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ varie comme $1-2\Phi$, plus ou moins en accord avec les modèles existants. Au-dessus de Φc=10,2%, la décroissance est plus rapide et $\frac{D(\Phi)}{D_0}=(1-2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi}+\frac{1}{3}\right)$ en accord avec le modèle de N. Destainville (Destainville 2008) prenant en compte la présence de trimères de BR dans la membrane observés ultérieurement en microscopie électronique. Par contre, dans le cas des lipides une décroissance linéaire de $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ rend bien compte de nos mesures sur toute la gamme de densités étudiée, mais la pente obtenue est plus importante, -2.19 au lieu de -2 comme prévu par le modèle hydrodynamique de Bussell et al. pour les lipides (Bussell et al. 1994)

Mots clés : Mouvement brownien/ Diffusion/ Modèle de Saffman-Delbrück/ Suivi de particule unique (SPT)/ Reconstitution de protéines membranaires/ Aspiration par micropipette/ Quantum dots/ Encombrement (« crowding ») des membranes/ Vésicules unilamellaires géantes (GUV) / Bactériorhodopsine/ Agrégats de protéines membranaires

Abstract:

Lateral diffusion of lipids and transmembrane proteins is essential for biological functions. In the cellular context, the surface fraction of membrane proteins is high, reaching approximately 50 to 70% depending on the membrane type. Therefore, diffusion occurs in a very crowded environment. The aim of this work is to study in vitro the effect of protein crowding on their own diffusion and on those of the surrounding lipids. So far, lateral diffusion measurements generally have been carried out at low protein density, and the effect of proteins crowding has not been much studied experimentally. We used a single particle tracking (SPT) method to track the trajectories of the Bacterorhodopsin (BR) proton pump and of lipids labeled with quantum dots at the bottom of giant unilamellar vesicles (GUVs) as a function of the total surface fraction (Φ) of BR reconstituted in 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) membrane. We have observed two regimes for the BR diffusion: a low density regime where the relative diffusion coefficient $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ varies as $1-2\Phi$, in relatively good agreement with the existing models. Above Φc=10.2%, the decay is faster and the variation $\frac{D(\Phi)}{D_0}=(1-2\Phi)\left(\frac{2}{3}\frac{\Phi_c}{\Phi}+\frac{1}{3}\right)$ corresponds well to N. Destainville's model (Destainville 2008) taking into account the presence of BR trimers in the membrane previously observed by electron microscopy. In contrast, in the case of lipids, $\frac{D(\Phi)}{D_0}$ varies linearly over the full density range but the slope is larger, -2.19 instead of -2, as predicted by the hydrodynamic model of Bussell et al.. (Bussell et al. 1994) for the lipids.

Keywords : Brownian motion / Diffusion / Saffman-Delbrück model / Single particle tracking (SPT) / Membrane protein reconstitution / Micropipette aspiration / Quantum dots / Crowding of membranes proteins / Giant unilamellar vesicles (GUV) / Bacteriorhodopsin / Membrane Protein clusters