

Modélisation de la dynamique des corps lipidiques chez Arabidopsis thaliana

François Deslandes

▶ **To cite this version:**

François Deslandes. Modélisation de la dynamique des corps lipidiques chez Arabidopsis thaliana. Systèmes dynamiques [math.DS]. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA042 . tel-03254115

HAL Id: tel-03254115
https://pastel.hal.science/tel-03254115

Submitted on 8 Jun 2021

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 PARIS-SACLAY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

NNT : 2017SACLA042

Thèse de doctorat

Modélisation de la dynamique des corps lipidiques chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Mathématiques Appliquées

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 12 décembre 2017, par

FRANÇOIS DESLANDES

Composition du Jury :

M. Patrick BOUTHEMY Directeur de recherche, INRIA (IRISA)	Président
M. Nicolas BRUNEL Maître de conférence, ENSIEE (LaMME)	Rapporteur
M. Pierre Sens Directeur de recherche, CNRS (PCC)	Rapporteur
M. Philippe Andrey Directeur de Recherche, INRA (IJPB)	Examinateur
M. Jean-Yves TINEVEZ Ingénieur de Recherche, Institut Pasteur (C2RT)	Examinateur
Mme Béatrice LAROCHE Directrice de Recherche, INRA (MaIAGE)	Directrice de thèse
M. Alain TRUBUIL Ingénieur de Recherche, INRA, (MaIAGE)	Co-encadrant, Invité

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes encadrants de thèse Béatrice Laroche et Alain Trubuil pour m'avoir encadré avec bienveillance. Je remercie chaleureusement Nicolas Brunel et Pierre Sens pour avoir accepté de rapporter ma thèse ainsi que Philippe Andrey, Patrick Bouthemy et Jean-Yves Tinevez pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je remercie les rapporteurs et les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je remercie également Charles Kervrann pour avoir accepté de participer à mes comités de thèse et pour ses conseils précieux lors ce ceux-ci.
Je remercie Bertrand Dubreucq et Martine Miquel de m'avoir fourni des données et pour les conseils et l'expertise qu'ils m'ont apportés. Je les remercie également pour leur patience et leur ouverture d'esprit.
Je tiens à remercier Abdou Rachid Thiam de m'avoir permis de travailler à l'ENS et avec qui j'ai eu plaisir à collaborer. Je remercie également Lionel Forêt avec qui j'ai eu plaisir à travailler. J'ai beaucoup appris grâce à sa rigueur, son enthousiasme et ses conseils avisés et bienveillants.
Je remercie également Sylvie Huet et Sandra Plancade auprès desquelles j'ai également beaucoup appris. Leur écoute attentive et leurs conseils m'ont été d'une aide précieuse pour réaliser une partie de ce travail de thèse.
Je remercie Sébastien, Arnaud, Natacha, Gaël, Sandra et Jean-Benoist pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée. Je remercie également Jade. C'était un plaisir d'être ton binôme de thèse, notamment mais pas seulement grâce à ton enthousiasme sans faille. Enfin, je remercie l'ensemble des membres du laboratoire MaIAGE que j'ai côtoyé pendant la durée de ma thèse. Découvrir la recherche dans un environnement aussi favorable a été une réel plaisir.

Table des matières

1 Introduction générale **8**
- 1.1 La biomasse végétale comme substitut aux énergies fossiles . . . 9
  - 1.1.1 La remise en cause du tout fossile . . . 9
  - 1.1.2 La biomasse comme source d'énergie et de composés chimiques . . . 9
  - 1.1.3 L'utilisation de l'huile végétale . . . 10
- 1.2 L'extraction de l'huile végétale . . . 11
- 1.3 Positionnement de la thèse . . . 12
  - 1.3.1 Plan de la thèse . . . 12

2 Biologie et biophysique des corps lipidiques **14**
- 2.1 Contexte historique . . . 15
- 2.2 Structure des corps lipidiques . . . 16
  - 2.2.1 Structure générale . . . 17
  - 2.2.2 Structure des corps lipidiques végétaux . . . 20
- 2.3 Biologie des corps lipidiques . . . 23
  - 2.3.1 Interactions dans le cadre du métabolisme des lipides . . . 23
  - 2.3.2 Autres interactions . . . 25
  - 2.3.3 Les corps lipidiques dans différents tissus . . . 25
- 2.4 Stockage et mobilisation des lipides . . . 25
  - 2.4.1 Stockage et déstabilisation des corps lipidiques . . . 26
  - 2.4.2 Mobilisation des ressources lipidiques . . . 27
- 2.5 Formation des corps lipidiques . . . 30
  - 2.5.1 Synthèse de lipides neutre et de protéines . . . 30
  - 2.5.2 Localisation et interactions . . . 30
  - 2.5.3 Modèles de formation *de novo* . . . 31
- 2.6 Synthèse des enjeux scientifiques en lien avec les corps lipidiques . . . 32
  - 2.6.1 Mécanismes biophysiques de la vie des corps lipidiques . . . 32
  - 2.6.2 Observation des corps lipidiques . . . 33
  - 2.6.3 Compréhension du rôle des protéines . . . 33

3 Biophysique des corps lipidiques et bourgeonnement **34**
- 3.1 Physique des membranes biologiques . . . 35
  - 3.1.1 Phénomènes d'interface . . . 35
  - 3.1.2 Membranes biologiques . . . 39
  - 3.1.3 Modélisation des membranes biologiques . . . 42
- 3.2 Un modèle de formation des corps lipidiques . . . 44
  - 3.2.1 Les phénomènes physiques de la formation des corps lipidiques . . . 45
  - 3.2.2 Modèle de bourgeonnement et équation de la forme . . . 47

3.2.3 Résolution numérique . . . 52
3.3 Résultats . . . 56
3.3.1 Modèle avec monocouches identiques et bicouche infiniment rigide . 57
3.3.2 Modèle complet . . . 60
3.3.3 Modèle avec monocouches différentes et bicouche infiniment rigide . 64
3.3.4 Tension de ligne . . . 65
3.3.5 Courbure spontanée . . . 66
3.3.6 Différences de pressions . . . 67
3.3.7 Interprétation des résultats . . . 67

4 Analyse d'images de corps lipidique et détection d'événements de fusion 69
4.1 Imagerie confocale des CLs d'A. thaliana . . . 70
4.1.1 Imagerie des corps lipidiques . . . 70
4.1.2 Production des jeux de données . . . 71
4.2 Méthode de segmentation . . . 72
4.2.1 Panorama des méthodes de segmentation . . . 72
4.2.2 Caractéristiques des objets à détecter et méthode . . . 72
4.2.3 Résultats . . . 78
4.3 Algorithmes de suivi automatique . . . 78
4.3.1 *Plus proche voisin* . . . 80
4.3.2 Tests multi-hypothèses et associations probabilistes . . . 80
4.3.3 Méthodes par résolution de problèmes d'optimisation . . . 80
4.3.4 Application et résultats . . . 82
4.4 Détection d'événements . . . 83
4.4.1 Méthode statistique pour détecter des événements de fusion . . . 88
4.4.2 Méthode heuristique pour détecter les fusions . . . 91
4.4.3 Comparaison et résultats . . . 93

5 Modélisation de la dynamique des corps lipidiques 100
5.1 Donnés d'imagerie de corps lipidiques . . . 101
5.2 Modèles de dynamiques des corps lipidiques . . . 101
5.2.1 Modèles à base d'agents . . . 104
5.2.2 Modèles d'interfaces . . . 106
5.2.3 Modèle de champ moyen . . . 107
5.2.4 Proposition de modèle . . . 109
5.3 Estimation de paramètres dans un modèle de coalescence . . . 112
5.3.1 Problème d'estimation de paramètres . . . 112
5.3.2 Estimation du taux de fusion . . . 117
5.3.3 Comparaison de populations . . . 119
5.3.4 Résultats . . . 121
5.4 Discussion . . . 125

6 Synthèse et conclusion 127
6.1 Modélisation du bourgeonnement des corps lipidiques . . . 127
6.1.1 Synthèse des résultats . . . 127
6.1.2 Perspectives . . . 128
6.2 Détection d'événements de fusion . . . 128
6.2.1 Synthèse des résultats . . . 128
6.2.2 Perspectives . . . 129

6.3 Modèle de la dynamique des corps lipidiques 129
6.3.1 Synthèse des résultats 129
6.3.2 perspectives 130
6.4 Apports pour la compréhension des corps lipidiques 130

Chapitre 1

Introduction générale

Contents

1.1 La biomasse végétale comme substitut aux énergies fossiles . 9
1.1.1 La remise en cause du tout fossile 9
1.1.2 La biomasse comme source d'énergie et de composés chimiques 9
1.1.3 L'utilisation de l'huile végétale 10
1.2 L'extraction de l'huile végétale 11
1.3 Positionnement de la thèse 12
1.3.1 Plan de la thèse 12

Ce chapitre introductif a pour but de motiver et d'introduire les travaux de thèse. La thèse présente un travail pluridisciplinaire de mathématiques appliqués, biologie et biophysque sur la «modélisation de la dynamique des corps lipidiques chez *Arabidopsis thaliana*». Cette introduction permet de situer les questions traitées dans la thèse dans un contexte plus général.

Les différents constats sur l'impact environnemental de l'utilisation des ressources fossiles conduisent à s'intéresser à l'utilisation de la biomasse comme source d'énergie. Cette partie propose une brève introduction sur l'utilisation de la biomasse comme substitut aux énergies fossiles puis détaille les enjeux liés à l'extraction de l'huile végétale. Des recherches récentes ont en effet mis en évidence le lien entre les rendements d'extraction et la structure des corps lipidiques, qui sont les organes de stockage de l'huile végétale. Les enjeux de la thèse en lien avec les recherches sur la structure et la biologie des corps lipidiques sont ensuite introduits. Ce chapitre s'achève par une description du plan de la thèse.

1.1 La biomasse végétale comme substitut aux énergies fossiles

1.1.1 La remise en cause du tout fossile

Les sociétés humaines ont depuis de très nombreuses années utilisé des ressources végétales comme source de nourriture mais aussi comme source d'énergie et de matériaux bruts. La découverte des ressources fossiles comme le charbon et le pétrole ont permis un développement énergétique important grâce à leur facilité d'exploitation et leur apparente abondance. Les industries chimiques et énergétiques ont, depuis le XXe siècle, concentré leurs exploitations sur ce type de ressources jusqu'à une récente prise de conscience des bouleversements écologiques en lien avec ces pratiques. En effet, la consommation de produits carbonés d'origine fossile a entraîné une forte augmentation de l'émission de gaz à effet de serre responsables du réchauffement climatique. Si les conséquences du réchauffement climatique restent encore mal connues, la prise de conscience globale des enjeux liés au climat, ainsi que l'accroissement de la demande énergétique et le constat de l'épuisement, même partiel, des ressources fossiles, ont conduit à l'impulsion d'un développement en faveur des sources d'énergie renouvelables, en particulier des sources d'énergie d'origine végétale.

De plus, l'évolution de la manière d'aborder les risques des composés chimiques pour l'environnement et la santé (directives REACH adoptés en 2007) [1] a conduit les industries à se tourner de plus en plus vers des composés chimiques d'origine végétale dont l'impact sur l'environnement est généralement moindre et qui sont souvent biodégradables.

1.1.2 La biomasse comme source d'énergie et de composés chimiques

La biomasse est définie par le loi de programme n° 2005-781 du 13 juillet 205 de la façon suivante :

> «la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers. »

La biomasse représente une réserve considérable d'énergie et de composés et possède des atouts qui font de son exploitation une alternative à l'utilisation de ressources fossiles plus polluantes et non renouvelables.

La définition précédente met en évidence l'aspect global de la biomasse dont l'utilisation est généralement intégrée dans le cadre de la bioéconomie. Cette dernière consiste à adopter une vision systémique de la production et la transformation durable de biomasse pour l'alimentation humaine et animale, la chimie, les matériaux et la production d'énergie [Colonna et al., 2015]. Les biotechnologies incluent l'ensemble des procédés biologiques utilisés pour améliorer ou sélectionner des végétaux ou produire des composés industriels à partir de micro-organismes ou d'enzymes et de biomasse végétale. L'utilisation des biotechnologies est commune aux différentes approches de la bioéconomie, qu'elles soient

1. La directive REACH est une réglementation européenne portant sur l'utilisation de substances chimiques. Elle contraint notamment les producteurs de substances chimiques à prouver les risques liés à leurs utilisations.

axées sur l'aspect technologique, comme aux États-Unis, ou sociétal, comme en Europe.

La biomasse est un réservoir de composés produits à partir du CO_2 et de l'énergie du soleil par la photosynthèse. En particulier, elle est une source de glucides, saccharose, acides animés, acides gras et de nombreuses molécules complexes.
Une partie des produits nécessite des transformations avant de pouvoir être utilisée dans l'alimentation ou dans des procédés industriels. En effet, la biomasse fournit des molécules de base complexes, contrairement aux molécules de base issues de ressources fossiles, et celles-ci doivent être transformées pour obtenir des fonctions similaires aux molécules d'origine fossile sur lesquelles la chimie organique est majoritairement basée. La transformation de molécules issues de la biomasse permet la production de bioplastiques, de polymères et de matériaux composites.
Une autre partie des produits issus de la biomasse est utilisable en l'état. En particulier, les acides gras sont utilisables directement dans l'alimentation, pour des solvants, des lubrifiants, des tensioactifs et du carburant.

Si la biomasse ne peut vraisemblablement pas se substituer totalement aux ressources fossiles, elle présente cependant de nombreux avantages. Parmi ces avantages, on peut citer :

— Fixation du carbone : la photosynthèse permet aux végétaux de produire et de stocker du carbone renouvelable à partir du CO_2 atmosphérique et de l'énergie solaire. Ce procédé permet de limiter l'effet de serre en réduisant la présence de CO_2 dans l'atmosphère.

— Les produits et co-produits sont valorisables, parfois directement. Il est parfois possible d'utiliser les *déchets* liés à la transformation de la biomasse ou d'utiliser directement des produits sans les transformer (comme les huiles végétales par exemple).

— Production de beaucoup d'énergie avec de bons rendements et en utilisant peu de ressources. La biomasse fournirait quatre fois plus d'énergie que sa production et sa valorisation n'en consomment, en utilisant peu de solvants et en polluant peu, [Morot-Gaudry, 2016].

— La biomasse représente un atout pour des pays comme la France qui ont peu de sources d'énergie fossile mais une grande surface agricole.

— La biomasse est une ressource peu exploitée. On estime que 10% de la biomasse terrestre est utilisable comme source d'énergie et aujourd'hui, seuls 3.5% sont utilisés [Morot-Gaudry, 2016].

Pour ces raisons, de nombreux travaux de recherche se concentrent sur l'exploitation efficace de la biomasse.

1.1.3 L'utilisation de l'huile végétale

L'huile végétale est une ressource issue de la biomasse qui peut être utilisée sans transformation à des fins alimentaires et industrielles. Les principales sources d'huiles végétales sont les graines des plantes oléagineuses (soja, colza, tournesol), qui peuvent contenir jusqu'à 50% d'huile et 17 à 25% de protéines, et les fruits riches en huiles (palme, olive, avocat). L'utilisation de l'huile végétale représente un intérêt économiquement important puisque la production d'huile végétale occupe 10% des terres arables exploitées

[Murphy, 2014]. La recherche de substituts aux énergies fossiles ainsi que les nouvelles réglementations, conduisent à s'intéresser plus particulièrement à ce type d'exploitation. Les chercheurs étudient le rendement des plantes, les techniques d'extraction et proposent de nouvelles façons de produire de l'huile, comme l'utilisation de microalgues, [Pienkos and Darzins, 2009].
La demande globale en huile végétale pour des besoins alimentaires et non-alimentaires est en augmentation, d'une part en raison de l'accroissement de la population et d'autre part en raison de la demande plus forte en biodiesel [Gunstone, 2011].

Aujourd'hui la demande en huile végétale est supérieure à la capacité de production. L'ajustement se fait donc par une augmentation du prix de l'huile végétale et par l'utilisation d'huile d'origine animale ou d'huile de friture. La prise en compte des problématiques liées à l'accroissement de la demande en huile végétale et à l'utilisation des sols conduit naturellement à s'intéresser à l'amélioration de la production intrinsèque des plantes et des rendements d'extraction.

1.2 L'extraction de l'huile végétale

L'existence d'une forte variabilité dans la proportion d'huile accumulée dans les graines de plantes oléagineuses suggère la possibilité d'augmenter de façon significative les rendements à travers l'ingénierie métabolique et le développement des techniques de culture des plantes [Murphy, 2014, Elhai et al., 2016].

La majeure partie de l'huile des graines est stockée dans les cellules de l'embryon. Dans les plantes, l'huile est stockée dans des organelles cellulaires appelées corps lipidiques dont les protéines principales sont les oléosines et les caleosines. Ces protéines ont un rôle dans la stabilité des corps lipidiques et leurs capacités à supporter de longues périodes de dormance et de dessiccation.

L'extraction de l'huile des graines nécessite généralement le pressage des graines et/ou l'utilisation de solvants. Elle conduit à la production de résidus appelés tourteaux qui sont réutilisés comme source de nourriture animale.

Au cours de l'extraction, deux facteurs influent sur la capacité à récupérer l'huile des graines [Campbell and Glatz, 2009]. Le premier concerne la stabilité des corps lipidiques, c'est-à-dire leur capacité à conserver leur taille et leur structure au cours de l'extraction. Le second porte sur la mobilité des corps lipidiques et est intrinsèquement lié à leurs tailles qui affectent leur capacité à pouvoir se déplacer à travers les cellules désintégrées par le pressage. Ces deux aspects sont fortement en lien avec la composition des corps lipidiques, en particulier avec la composition en oléosines qui affecte la taille des corps lipidiques [Miquel et al., 2011, Boulard et al., 2015].

De nombreux projets de recherche ont donc consacré leurs efforts à comprendre le lien entre la structure des corps lipidiques et l'extraction de l'huile végétale. Le développement de ces recherches est notamment en lien fort avec les techniques d'observation, en particulier la microscopie et les biotechnologies qui permettent une exploration fine de la structure des corps lipidiques, du rôle des protéines et de leurs interactions avec les autres éléments de la cellule. De plus, les progrès dans la culture des plantes permettent d'espérer des avancées significatives pour obtenir des plantes avec de forts rendements afin de pouvoir répondre à l'accroissement de la demande en huile végétale.

1.3 Positionnement de la thèse

Les constats sur l'importance de l'utilisation des huiles végétales dans le contexte de la recherche de substituts aux énergies fossiles et ceux sur la production et la demande actuelle en huile végétale conduisent à des recherches appliquées et fondamentales. Elles portent sur l'amélioration de l'extraction de l'huile végétale à partir de graines d'une part, et d'autre par sur des aspects théoriques concernant la structure des corps lipidiques et le rôle des protéines en lien avec la biologie du corps lipidique.

Arabidopsis thaliana est une plante modèle largement utilisée dans ce contexte en raison de sa simplicité de culture, parce que son génome est bien connu et également à cause de sa proximité avec des plantes très cultivées pour leur huile comme le colza (*Brassica napus*). La production de plusieurs mutants qui n'expriment pas certaines oléosines a permis une meilleure compréhension des rôles de chaque oléosine [Miquel et al., 2014], en particulier grâce à l'observation des corps lipidiques de jeunes embryons par microscopie confocale.

L'évolution des techniques de microscopie permet maintenant d'observer les embryons d'*A. thaliana* en 3D en suivant leur évolution dans le temps et conduit à l'observation directe d'événements de fusion entre corps lipidiques. De plus, l'introduction de concepts issus de la physique [Thiam et al., 2013] pour appréhender les mécanismes de la biologie des corps lipidiques ainsi que le développement de modèles mathématiques et informatiques [Boschi et al., 2017, Trigui, 2014] ouvrent des perspectives intéressantes pour mieux comprendre l'influence de certains facteurs et l'importance relative des différents mécanismes proposés par les biologistes pour expliquer et comprendre la biologie des corps lipidiques.

1.3.1 Plan de la thèse

Le travail de thèse est exposé en quatre chapitres relativement indépendants et qui traitent chacun un aspect du travail de thèse.

Le chapitre 2 propose un rapide état de l'art sur la biologie des corps lipidiques. Il présente la structure et la biologie des corps lipidiques dans un premier temps puis développe les aspects liés à la formation, au stockage et à la dégradation des corps lipidiques. Enfin, une dernière section présente les enjeux scientifiques en lien avec les corps lipidiques et introduit les questions traitées dans les chapitres suivants.

Le chapitre 3 est consacré au développement et à l'étude d'un modèle de la formation des corps lipidiques. Ce modèle s'appuie sur la modélisation des membranes impliquées dans le bourgeonnement des corps lipidiques depuis le réticulum endoplasmique, une organelle en lien avec la production de lipides et de protéines. La méthode retenue s'appuie sur la modélisation de la membrane du réticulum endoplasmique et des membranes entourant une goutte de lipides et sur le calcul des formes d'équilibre du modèle en fonction de paramètres comme la tension et la rigidité des membranes. En particulier, on s'intéresse au phénomène de bourgeonnement des gouttes, c'est-à-dire au passage de gouttes initialement allongées à des gouttes sphériques.

Dans le chapire 4, on se propose de détecter des événements de fusion dans des images de microscopie confocale 3D+temps. Ce travail fait appel à des techniques de traitement d'images de microscopie. La méthode repose sur la détection d'objets puis sur le suivi des trajectoires de ces objets. Enfin, les événements de fusion sont détectés par vérification d'une loi de conservation du volume au cours de l'événement de fusion basée sur des tests d'hypothèses statistiques. L'objectif de cette étude est de détecter les événements de fusion pour plusieurs mutants exprimant certaines oléosines et de les comparer afin de déterminer si le génotype influe sur la proportion d'événements de fusion observés.

Le chapitre 5 propose un modèle de l'évolution des distributions de volumes de corps lipidiques au cours du développement des jeunes embryons d'*A. thaliana*. Dans une première partie, une revue des modèles existant est donnée puis un modèle basé sur une équation différentielle modélisant la fusion de gouttes deux à deux est développé. Une seconde partie propose un estimateur du taux de fusion des corps lipidiques puis compare les taux de fusion dans différents mutants à partir de tests statistiques.

Enfin, un dernier chapitre propose une synthèse des résultats obtenus dans chacune des parties et développe les perspectives de poursuite de ces travaux. Cette partie s'achève par une synthèse des apports de la thèse pour la compréhension de la biologie des corps lipidiques.

Chapitre 2

Biologie et biophysique des corps lipidiques

Contents

2.1 Contexte historique 15
2.2 Structure des corps lipidiques 16
2.2.1 Structure générale 17
Géométrie et localisation 17
Composition 17
Rappel sur les membranes biologiques 18
La membrane du corps lipidique 18
Lipoprotéines 20
2.2.2 Structure des corps lipidiques végétaux 20
Comparaison des protéines entre les organismes 20
Protéines des corps lipidiques des graines d'A. thaliana 21
Oléosines 21
Autres protéines 23
2.3 Biologie des corps lipidiques 23
2.3.1 Interactions dans le cadre du métabolisme des lipides 23
2.3.2 Autres interactions 25
2.3.3 Les corps lipidiques dans différents tissus 25
2.4 Stockage et mobilisation des lipides 25
2.4.1 Stockage et déstabilisation des corps lipidiques 26
Synthèse locale 26
Coalescence 26
Mûrissement d'Ostwald 27
Fission 27
2.4.2 Mobilisation des ressources lipidiques 27
Lipolyse 29
Lipophagie 30
2.5 Formation des corps lipidiques 30
2.5.1 Synthèse de lipides neutre et de protéines 30
2.5.2 Localisation et interactions 30
2.5.3 Modèles de formation *de novo* 31

Bourgeonnement 31
Bicelle 32
Bourgeonnement vésiculaire 32
2.6 Synthèse des enjeux scientifiques en lien avec les corps lipidiques 32
2.6.1 Mécanismes biophysiques de la vie des corps lipidiques 32
2.6.2 Observation des corps lipidiques 33
2.6.3 Compréhension du rôle des protéines 33

Ce chapitre présente un état de l'art des connaissances sur les corps lipidiques. Il commence par un rappel historique puis une description de la structure des corps lipidiques, notamment chez les plantes. La section suivante présente la biologie des corps lipidiques et leurs interactions avec les autres organelles de la cellule. Les mécanismes impliqués dans le stockage et la mobilisation des lipides sont ensuite décrits. Une présentation des modèles de formation des corps lipidiques est donné. Ce chapitre s'achève sur une présentation des enjeux scientifiques en lien avec les corps lipidiques et une présentation des questions abordés dans les chapitres suivants

2.1 Contexte historique

L'étude des corps lipidiques a toujours été en fort lien avec les techniques d'observation des systèmes vivants. Les corps lipidiques sont de plus en plus étudiés notamment grâce à l'évolution des techniques d'observation d'une part et des biotechnologies d'autre part qui permettent une plus grande finesse d'analyse. De nombreux articles récents soulignent ce regain d'intérêt pour l'étude des corps lipidiques et mentionnent le fait qu'ils ont longtemps été considérés comme des organes relativement inertes. Cependant, la perspective historique montre que les corps lipidiques ont suscité l'intérêt des scientifiques depuis leurs premières observations. En effet, quelques dizaines d'années après l'observation de corps lipidiques, appelés à l'époque microsomes, par Hanstein en 1880 avec des outils de microscopie optique, [von Hanstein, 1880], Pierre Dangeard s'intéresse à nouveau aux corps lipidiques, [Dangeard, 1919, Dangeard, 1922], qu'il renomme sphérosomes. Ils font alors l'objet d'un grand débat, fondamental pour la biologie, sur la classification des organelles cellulaires. Le débat, qui a lieu dans le cadre de discussions générales sur la classification des organelles cellulaires, porte principalement sur le rôle et les fonctions à donner aux corps lipidiques et leurs appartenance à la classe des mitochondries ou à une classe à part, [Guilliermond, 1923].

La séparation dans les fonctions et l'origine des corps lipidiques est définitivement montrée grâce à l'utilisation de la microscopie électronique par Frey-Wyssling et al, [Frey-Wyssling et al., 1963], qui montrent en particulier que les corps lipidiques ont pour origine le réticulum endoplasmique. Plus tard, Yatsu et Jacks, proposent d'appeler les corps lipidiques oléosomes, [Yatsu et al., 1971], et utilisent la microscopie électronique pour mettre en évidence pour la première fois la structure de demi-membrane du corps lipidique, [Yatsu and Jacks, 1972]. Ces résultats sont plus tard confirmés par des recherches

qui explorent plus en détails la composition de la membrane , [Tauchi-Sato et al., 2002].

Après cette période, à partir des années 1980, les recherches portent principalement sur la composition en lipides neutres, phospholipides et protéines des corps lipidiques. Un intérêt particulier est porté sur le rôle et la spécificité des protéines ainsi que les fonctions des corps lipidiques et la mobilisation des lipides neutres. Les travaux récents reposent largement sur l'observation des corps lipidiques par la microscopie. Parmi ces travaux, quelques uns ont recours à la modélisation à des fins principalement exploratoires. Une attention particulière est portée sur le rôle des protéines des corps lipidiques et les mécanismes qui gouvernent leurs interactions avec les corps lipidiques. Thiam et al, [Thiam et al., 2013, Thiam and Forêt, 2016], proposent une approche basée sur la physique des émulsions et de la matière molle pour comprendre et expliquer les mécanismes qui régissent la vie des corps lipidiques.

2.2 Structure des corps lipidiques

Le flux d'énergie métabolique est à la base de la vie de la cellule qui doit mobiliser des ressources pour le conserver. Ce défi pour la cellule nécessite de pouvoir stocker les ressources lorsqu'elles sont en excès. Le stockage a lieu pour pratiquement tout type de cellule et se fait principalement sous la forme de triacylglycerols, dans les corps lipidique. Lorsque la cellule a besoin d'énergie, les triacylglycerols sont dégradés en acides gras pouvant être oxydés pour produire de l'énergie en cas de déficit de carbone. Il est important de noter que le rôle des corps lipidiques ne se limite pas au stockage de lipides neutres, comme souligné dans des revues récentes [Walther and Farese Jr, 2012, Thiam et al., 2013, Fujimoto and Parton, 2011, Pol et al., 2014], mais qu'ils interviennent aussi dans le stockage d'esters de stérols, la création de membrane cellulaire et la division cellulaire [Wilfling et al., 2013].

Les corps lipidiques sont des organelles intracellulaires centrales dans la vie d'une cellule puisqu'ils contiennent une grande partie de ses ressources énergétiques sous forme de lipides neutres. De plus, il a été observé, [Czabany et al., 2008, Kory et al., 2016], que de par sa structure particulière d'interface entre un milieu organique (phase de lipides neutres) et un milieu aqueux (cytosol), le corps lipidique peut servir d'ancrage à certaines protéines ou même de contenant pour des molécules potentiellement toxiques dans le cytosol [Walther and Farese Jr, 2012].

Si la structure générale du corps lipidique est conservée entre les différentes espèces, [Czabany et al., 2008, Goold et al., 2015, Brasaemle, 2007], on observe malgré tout de nombreuses différences de composition en phospholipides comme en protéines [D'Andrea, 2016]. La spécificité du règne végétal, en particulier chez les plantes oléagineuses, provient principalement des protéines du corps lipidique, les oléosines. Leurs structures est de mieux en mieux comprise, cependant, leurs fonctions restent assez mal connues malgré de récentes découvertes mettant en évidence leur lien avec certaines pathologies, leur rôle dans la gestion des acides gras et de certaines protéines ou encore dans la réponse immunitaire [Welte, 2015].

L'objet de cette section est d'exposer les spécificités structurelles des corps lipidiques avec une attention particulière pour les corps lipidiques végétaux et leurs protéines.

Source	Diamètre (μm)
Graines	0.5-2
Levures	0.4
Adipocytes	100
A. thaliana	2.6
Lipoprotéines	0.01-0.8

TABLE 2.1 – Diamètres moyen des corps lipidiques et des lipoprotéines chez différentes espèces, extrait de [Czabany et al., 2008, Shimada et al., 2008, Walther and Farese Jr, 2012, Jolivet et al., 2004]. Le diamètre moyen des lipoprotéines est donné ici pour référence.

2.2.1 Structure générale

Cette section présente la structure générale des corps lipidiques. Elle présente notamment la géométrie des corps lipidiques, leurs interactions, leur composition. Les propriétés de la membrane des corps lipidiques sont détaillées après un bref rappel sur les membranes biologiques. La membrane du corps lipidique et sa composition en protéine lui confère des fonctions spécifiques. Enfin, les différences avec les lipoprotéines, des structures proches des corps lipidiques, sont exposées.

Géométrie et localisation

La microscopie optique et confocale révèle que les corps lipidiques sont localisés dans le cytoplasme de nombreuses cellules, principalement les adipocytes et les graines de plantes [Tauchi-Sato et al., 2002], et ont des formes plutôt sphériques. Leurs diamètres varient en fonction de l'espèce et du type de cellule considérés et vont de quelques centaines de nanomètres à quelques microns, comme l'indique le tableau 2.1. Les corps lipidiques ne semblent pas avoir de localisation précise dans le cytoplasme mais certains auteurs pointent une affinité pour certaines organelles cellulaires (noyau, corps protéiques) [Campbell and Glatz, 2009], les bords des cellules [Miquel et al., 2014], le réticulum endoplasmique, ou encore les membranes cellulaires chez les bactéries [Walther and Farese Jr, 2012].

La population de corps lipidiques au sein d'une cellule varie au cours du temps et peut aller de quelques corps lipidiques pour les adipocytes [Walther and Farese Jr, 2012] à plusieurs centaines de corps lipidiques dans certaines graines [Purkrtova et al., 2008, Murphy et al., 2001]. Le nombre et la taille des corps lipidiques ne sont pas fixes et évoluent en fonction de l'environnement et des besoins de la cellule.

Il a été observé que les corps lipidiques peuvent se déplacer aléatoirement sur de petites distances et de façon dirigée sur des microtubules [Fujimoto and Parton, 2011]. Dans certains cas, ils peuvent aussi se regrouper sous l'action de certaines protéines ou lors de la production de lipides neutres [Walther and Farese Jr, 2012].

Composition

Le cœur des corps lipidiques est composé de lipides neutres, principalement des triacyglycerols et des esters de stérols. Les acides gras, qui sont des sources d'énergie pour la cellule, sont lipotoxiques et peuvent endommager la cellule lorsqu'ils sont libres dans le cytosol, c'est pourquoi ils sont transformés en triacylglycerols et stockés dans les corps li-

Source	Lipides neutres	Protéines	Phospholipides
Graine de sésame	97.37	0.59	0.57
Graine de maïs	97.58	1.43	0.91
Graine de colza	94.21	3.46	1.97
Sacaromises cerevisae	95.6	2.6	1.3
Cellules de mammifères	90.2	4.8	4.5

TABLE 2.2 – Composition de corps lipidiques pour différentes espèces, extrait de [Tzen et al., 1993, Bartz et al., 2007, Leber et al., 1994, Goold et al., 2015]. Les chiffres sont exprimés en pourcentage de la masse du corps lipidique, la fraction non exprimée comporte principalement des acides gras libres.

pidiques [D'Andrea, 2016]. La structure interne des corps lipidiques est mal connue mais il se peut que les triacylglycerols et les esters de stérols forment des domaines isolés à l'intérieur d'un même corps lipidique, [Fujimoto and Parton, 2011]. Le corps lipidique est aussi, comme toute organelle, composé d'une membrane de phospholipides et de cholestérol ainsi que de protéines. Le tableau 2.2 montre qu'il existe des différences de compositions entre différentes espèces malgré la structure commune des corps lipidiques.

La membrane du corps lipidique est cependant unique dans le monde vivant puisqu'elle sépare la phase aqueuse du cytosol du contenu organique du corps lipidique. Elle a une structure similaire dans les différents règnes et c'est la composition de la membrane, notamment en protéines, qui confère aux corps lipidiques leurs spécificités.

Rappel sur les membranes biologiques

La membrane plasmique, tout comme celle de certaines organelles chez les eucaryotes, joue un rôle de premier plan dans la biologie de la cellule et des organelles intra-cellulaires. En particulier, les fonctions spécifiques de chaque membrane sont fortement liées à leurs compositions et notamment aux protéines qui interagissent avec celle-ci. Les membranes biologiques sont composées principalement de phospholipides et de cholestérols qui sont des molécules polaires qui s'organisent généralement en deux feuillets d'une épaisseur d'environ $4-6nm$, en opposant leurs parties hydrophobes, rendant la membrane imperméable aux molécules et ions solubles en milieu aqueux. La composition en lipide influence les propriétés physiques de la membrane, notamment la diffusion latérale des lipides à travers la membrane en impactant la viscosité, l'épaisseur et la courbure locale. La courbure locale de la membrane est liée à la géométrie des phospholipides qui la composent qui peuvent avoir des formes de cônes ou de cylindres. La courbure des phospholipides joue un rôle majeur dans la forme de la membrane et donc sur ses fonctions. Les protéines qui interagissent avec les membranes peuvent être intégrales, c'est à dire qu'elles traversent la membrane, ancrées sur les phospholipides ou bien périphériques.

La membrane du corps lipidique

Le corps lipidique ne fait pas exception et possède une membrane. Cependant, comme le révèle la microscopie cryoélectronique [Tauchi-Sato et al., 2002], la membrane est composée d'un seul feuillet, figure 2.1. La demi-membrane du corps lipidique est donc une structure unique d'interface entre un milieu aqueux (cytosol) et un milieu organique (li-

Source	PC	PE+PS	SM	C
Membrane plasmique (*E. coli*)	0	85	0	0
Réticulum endoplasmique (rat)	54	26	5	7
Corps lipidique de graine de sésame	41.2	37.9	-	-
Corps lipidique de graine de mais	64.1	28.3	-	-

TABLE 2.3 – Composition en phospholipides et cholesterol de plusieurs membranes biologiques, extrait de [Lodish et al., 1995, Tzen et al., 1992]. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la composition en phospholipides et cholesterol.

pides neutres) et est le siège du métabolisme des corps lipidiques et des processus qui lui sont associés. De plus, cette interface est utilisée par la cellule pour isoler certains composés dangereux en milieux aqueux [Walther and Farese Jr, 2012, D'Andrea, 2016], ou comme point d'ancrage transitoire de certaines protéines [Kory et al., 2016].

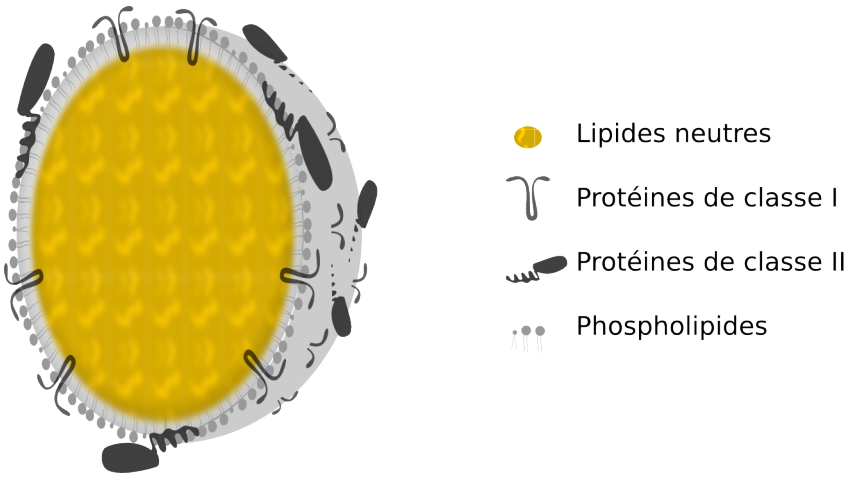


FIGURE 2.1 – Représentation schématique d'une coupe d'un corps lipidique.

La composition de sa membrane ne diffère pas fortement des membranes biologiques classiques puisqu'elle comporte principalement des phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserines (PS), sphingomyelin (SM) Cholesterol (C), voir Tableau 2.3. En revanche, la spécificité de cette interface explique la forme sphérique adoptée par les corps lipidiques. La configuration sphérique permet de minimiser l'interface entre les lipides neutres et le cytosol, [Vindigni, 2011]. La géométrie adoptée par les corps lipidiques et la capacité à former et maintenir leur membrane, peut avoir un impact fort sur le fonctionnement du métabolisme des lipides. En effet, de nombreuses pathologies sont associées à des corps lipidiques trop peu nombreux dans une même cellule ou trop gros. Les protéines des corps lipidiques ont un rôle majeur dans leur morphologie. De nombreux travaux indiquent que la présence plus ou moins importante de protéines conduit à des corps lipidiques plus ou moins gros [Tzen et al., 1992, Shimada et al., 2008].

Contrairement à leur structure conservée, la composition en protéines des corps lipidiques varie fortement entre les règnes et au cours de la vie du corps lipidique. Chez les mammifères, les protéines les plus représentées sont les périlipines, qui ont un rôle de régulation des enzymes en lien avec la synthèse et la consommation des triacylglycerols et des enzymes du métabolisme des phospholipides [Kory et al., 2016]. Chez les plantes, les

protéines les plus représentées sont les oléosines, suivies des caléosines et des steroléosines. Ces protéines ont des liens avec le métabolisme des lipides et la régulation de la taille des corps lipidiques. La section 2.2.2 détaille le rôle de ces protéines.

En général, les protéines accèdent aux corps lipidiques de deux manières, [Kory et al., 2016] : par le réticulum endoplasmique (classe I) et par le cytosol (classe II). Peu d'éléments sont confirmés sur les détails et les raisons de ce ciblage qui se fait probablement par une structure en épingle à cheveux ou bien par une séquence N-terminale hydrophobe. De même, on dispose de relativement peu d'information sur le remplacement et la dégradation de ces protéines. Les protéines de classe II se lient aux corps lipidiques par des mécanismes spécifiques et non spécifiques aux corps lipidiques. Les mécanismes connus à ce jour font intervenir des hélices amphiphatiques et des interactions hydrophobes. L'encombrement macromoléculaire est un phénomène évoqué pour expliquer le retrait de ces protéines de la surface des corps lipidiques [Kory et al., 2015] cependant la régulation de la composition en protéine des corps lipidiques reste une question ouverte, [Kory et al., 2016].

L'étude des protéines des corps lipidiques chez des organismes unicellulaires comme les levures ou les microalgues montre que les protéines principales des corps lipidiques ne présentent pas de similarités particulières avec les périlipines ou les oléosines, [D'Andrea, 2016]. Ces observations suggèrent que la structure commune et conservée des corps lipidiques est importante pour le stockage des lipides neutres et que les fonctions et mécanismes spécifiques des corps lipidiques d'une espèce donnée sont liés aux protéines qui les composent.

Lipoprotéines

Les corps lipidiques partagent une partie de leurs caractéristiques avec les lipoprotéines mais sont cependant des entités très différentes. Ces dernières, plus petites (quelques dizaines à quelques centaines de nm), sont formés d'un cœur de lipides neutres entourés de phospholipides et de protéines, les apolipoprotéines. En revanche, contrairement aux corps lipidiques, dont le rôle principal est le stockage de lipides, les lipoprotéines remplissent principalement une fonction de transport et de distribution de lipides [Walther and Farese Jr, 2012]. Les lipoprotéines sont présentes seulement dans quelques types cellulaires chez les mammifères, à l'inverse des corps lipidiques qui sont présents dans de très nombreux règnes et types cellulaires.

2.2.2 Structure des corps lipidiques végétaux

Cette section a pour but de présenter les spécificités des corps lipidiques chez les végétaux. Elle commence pas une comparaison du rôle des protéines du corps lipidiques chez les mammifères et chez les plantes puis détaille les différentes protéines des corps lipidiques végétaux, leurs structures et leurs fonctions.

Comparaison des protéines entre les organismes

La structure de cœur de lipide neutre entouré d'une demi-membrane de phospholipides, cholestérol et de protéines est conservée entre les différents règnes. Les protéines du corps lipidique sont impliquées dans le métabolisme des lipides, le trafic membranaire, les mécanismes de signalisation et la dégradation de protéines.

Il existe notamment un certain nombre de similitudes entre les périlipines et les oléosines qui sont les protéines principales de corps lipidiques respectivement chez les mammifères et chez les plantes. Ces protéines ont un rôle sur la stabilité des corps lipidiques. En effet, elles permettent aux corps lipidiques de maintenir leur structure en empêchant la coalescence ou en atténuant la mobilisation des lipides. Dans ce contexte, la stabilité correspond à la capacité à conserver sa forme et sa structure dans le temps. Les corps lipidiques peuvent être déstabilisés par plusieurs mécanismes. D'une part, la coalescence crée des corps lipidiques plus gros et qui exposent donc une surface plus petite en proportion du volume. D'autre part, la mobilisation des lipides conduit à des corps lipidiques plus petits. Or la taille des corps lipidiques est un aspect très important puisqu'elle influence la capacité à mobiliser efficacement les lipides. En effet, des corps lipidiques trop gros exposent peu de surface par rapport à un volume équivalent réparti sur de plus petits corps lipidiques et les protéines capables de dégrader les lipides neutres disposent donc de moins de place pour se fixer aux corps lipidiques. Des corps lipidiques trop petits entraînent l'effet inverse. De nombreuses observations ont confirmé le rôle de ces protéines, cependant, les raisons de ce phénomène sont encore mal comprises.

Les oléosines sont les protéines principales des corps lipidiques mais ne présentent pas d'homologues chez les mammifères. Il existe en effet de nombreuses différences avec les périlipines, qui sont les principales protéines des corps lipidiques chez les mammifères. D'une part, contrairement aux périlipines, aucune étude ne révèle de lien direct entre le oléosines et la mobilisation des lipides neutres et rien ne suggère que les oléosines jouent un rôle dans l'activation ou l'ancrage des lipases. Ensuite, les oléosines sont des protéines intégrales contrairement aux périlipines. Il est intéressant de noter cependant que, chez les mammifères, des protéines comme les cavéolines possèdent des mécanismes d'attache aux corps lipidiques similaires à ceux des oléosines. Enfin, les périlipines ont plusieurs mécanismes d'attache aux corps lipidiques, sont au moins transitoirement cytosoliques et peuvent se déplacer d'un corps lipidique à l'autre, contrairement aux oléosines qui sont localisées à la surface du réticulum ou sur celle des corps lipidiques.

Protéines des corps lipidiques des graines d'A. thaliana

Les protéines principales des corps lipidiques chez les plantes sont les oléosines. Elles ne présentent pas d'homologue chez les mammifères malgré un certain nombre de similarités avec certaines protéines présentes sur les corps lipidiques des mammifères. Les protéines des corps lipidiques ont des rôles majeurs dans les propriétés des corps lipidiques, cependant, certaines de leurs fonctions restent à clarifier. Cette section présente les principales caractéristiques et fonctions des protéines des corps lipidiques des graines d'*A. thaliana*.

Oléosines

Les oléosines font partie de la famille de protéines la plus représentée sur les corps lipidiques des graines. Elles représentent 79% du contenu protéique des graines matures chez *A. thaliana*, [D'Andrea, 2016]. Ce sont de petites protéines composées de trois domaines structuraux :

— Un domaine central hydrophobe d'environ 70 résidus, très conservé entre les différentes isoformes et présentant une forte affinité pour les corps lipidiques.

— Un domaine N-terminal hydrophile de 50-70 résidus.

Propriété	S1	S2	S3	S4	S5
Taille	36/75/63	51/75/63	45/72/56	53/72/74	29/72/47
Masse (kDa)	19.8	20.3	18.5	21.2	14.9
Abondance	5	4	1	2	3
Hydrophobie 1	3	2	4	1	5
Hydrophobie 2	4	2	3	1	5
Hydrophobie 3	4	3	1	2	5

TABLE 2.4 – Propriétés des oléosines extrait de [Kim et al., 2002]. La taille est donnée en nombre d'acides aminés pour la partie N-terminale, le domaine central et la partie C-terminale. Le premier classement d'hydrophobie est donné en fonction de l'inverse de taille, le second provient de résultats expérimentaux et le troisième est issu de prédictions [D'Andréa et al., 2007].

— Un domaine C-terminal hydrophile de taille variable.

Les oléosines ne possèdent pas de séquence dédiée au signalement et par conséquent, la conformation qu'elles adoptent est supposée responsable de leurs localisations sur les corps lipidiques. Les domaines N- et C- terminaux sont situés à la surface des corps lipidiques en raison de leurs propriétés hydrophiles tandis que le domaine central est inséré dans la matrice de lipides neutre du corps lipidique. Les oléosines couvrent une grande partie de la surface des corps lipidiques des graines [Huang, 1996, Frandsen et al., 2001].

Les oléosines sont synthétisées sur les ribosomes puis localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Elles s'attachent aux corps lipidiques en formation depuis la surface du réticulum. Les oléosines seraient situées principalement sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique [Murphy, 1993, Loer and Herman, 1993]. La synthèse des oléosines peut être synchrone à la synthèse des lipides ou asynchrone, [Purkrtova et al., 2008]. Elles sont dégradées avant la mobilisation des triacylglycerols par les lipases, des protéines responsables de la dégradation des lipides neutres.

Les oléosines sont principalement étudiées dans les corps lipidiques de graines mais elles se retrouvent dans de nombreux autres tissus comme les feuilles, le pollen et les fruits par exemple. Au total, 16 gènes codent pour les oléosines dont cinq pour les oléosines présentes dans les graines. Ces cinq isoformes diffèrent par leur masse et leurs propriétés physiques, comme l'indique le tableau 2.4.

L'étude du rôle des oléosines est possible notamment grâce à la production de mutants n'exprimant pas ou surexprimant certaines oléosines. Les mutants n'exprimant pas certaines oléosines présentent des corps lipidiques plus gros que chez la plante sauvage [Shimada and Hara-Nishimura, 2010, Siloto et al., 2006, Miquel et al., 2014, Huang, 1996]. Cette tendance est confirmée par des expériences réalisées avec des corps lipidiques purifiés ou reconstitués [Peng et al., 2003]. On en déduit que les oléosines influent sur la taille des corps lipidiques. Il est couramment suggéré que les oléosines impactent la stabilité des corps lipidiques [Laibach et al., 2015], c'est-à-dire leur capacité à les maintenir en petites entités. Les oléosines pourraient empêcher la coalescence des corps lipidiques et ainsi les maintenir à une certaine taille. Cependant les mécanismes responsables de ce phénomène ne sont pas bien explicités.

La présence d'oléosine est directement corrélée avec la capacité de la graine à germer.

En effet, certains auteurs ont montré en utilisant des mutants ayant un niveau d'expression plus faible des oléosines que les oléosines ont un impact sur la capacité de la graine à germer [Shimada and Hara-Nishimura, 2010]. De plus, la présence d'oléosines permet à la graine de mieux résister au froid [Shimada et al., 2008], en empêchant la fusion des corps lipidiques, ce qui facilite par la suite la mobilisation des lipides neutres.

Autres protéines

Les caléosines sont d'autres protéines des corps lipidiques de plantes. Elles sont appelées ainsi en raison de leur homologie avec une protéine présente dans le riz qui possède, comme les caléosines, un site d'attache du calcium. Cette structure suggère une possible régulation des caléosines par le calcium [Frandsen et al., 2001]. Ces protéines ont une structure similaire à celle des oléosines et favorisent la stabilité des corps lipidiques bien que leurs rôles soient différents. Les caléosines favorisent les interactions des corps lipidiques avec d'autres organelles comme les vacuoles [Purkrtova et al., 2008, Frandsen et al., 2001].

D'autres protéines comme les stéroléosines ou les protéines de la famille REF (*Rubber Elongation Factor*, spécifiques à certains corps lipidiques n'ayant pas d'oléosines) sont associées aux corps lipidiques. Les stéroléosines sont liées à la synthèse des stérols [Shimada and Hara-Nishimura, 2010, Lin et al., 2002], mais leurs fonctions restent à éclaircir.

2.3 Biologie des corps lipidiques

Les fonctions des corps lipidiques, leurs interactions avec les autres organes de la cellule et leur rôle dans différentes voies métaboliques peuvent être divisés en deux groupes. L'un regroupe toutes les fonctions et interactions en lien avec le métabolisme des lipides et l'autre contient toutes les interactions et fonctions mises en évidence récemment et qui suggèrent un rôle plus large pour les corps lipidiques.

Les corps lipidiques interagissent directement ou indirectement avec plusieurs autres organelles et structures cellulaires, en particulier avec le réticulum endoplasmique, qui est le siège de la production des lipides neutres et des phospholipides. Le transport et le stockage des lipides est d'une importance particulière pour les cellules qui doivent pouvoir les stocker malgré leur insolubilité dans l'eau pour pouvoir les mobiliser de façon efficace en cas de besoin en énergie ou en cas de création de membrane. Les corps lipidiques ont un rôle central dans le maintien du flux de lipides de la cellule et font intervenir des mécanismes spécifiques de régulation, notamment dans la production *de novo* de corps lipidiques et dans la régulation des corps lipidiques matures.

De nombreuses autres fonctions ont été mises en évidence et suggèrent des interactions encore mal comprises avec le noyau, les neurones et dans certaines pathologies virales.

2.3.1 Interactions dans le cadre du métabolisme des lipides

L'interaction avec le réticulum endoplasmique apparaît comme fondamentale pour les corps lipidiques car c'est le lieu de synthèse des lipides neutres, des phospholipides et des protéines intégrales présentes à la surface des corps lipidiques y sont localisées. Il est donc naturel de supposer qu'il existe un transfert des lipides neutres depuis le réticulum vers les corps lipidiques, en particulier pour les tissus spécialisés comme les tissus adipeux et les graines. Cependant, plusieurs mécanismes de transfert ont été avancés et observés mais leur importance ainsi que leur présence dans certains tissus reste une question ouverte. Parmi les mécanismes en lien avec le stockage des lipides on peut citer les quatre suivants :

— Par diffusion passive depuis le réticulum, auquel le corps lipidique serait connecté par un fin canal.

— Par synthèse locale de lipides grâce à des enzymes localisées à la surface des corps lipidiques et catalysant la synthèse des lipides.

— Par des mécanismes de transports dédiés. Il faut cependant noter qu'aucune protéine permettant d'étayer cette hypothèse n'a à ce jour été identifiée.

— Par fusion de corps lipidiques. Dans ce mécanisme, deux corps lipidiques matures proches fusionnent leurs contenus et leurs membranes. Ce mécanisme peut permettre de stabiliser le corps lipidique en optimisant la surface exposée pour un volume donné.

— La fission de corps lipidiques est aussi un mécanismes possible pour organiser le stockage des lipides. Dans ce cas, un corps lipidique se divise en deux corps lipidiques plus petits.

Plus de détails sur ces mécanismes et en particulier sur le rôle de la structure et de la composition des corps lipidiques seront donnés dans la section 2.4.1. Pour bien comprendre la vie des corps lipidiques, il est important de faire une distinction entre les aspects en lien avec la création *de novo* de corps lipidiques et la dynamique des corps lipidiques matures. Malgré une apparente similarité dans les processus de croissance et de formation entre les corps lipidiques matures et corps lipidiques en formation, ils font intervenir des mécanismes et des contextes très différents. Les sections 2.4.1 et 2.5 présentent en détails ces différences. La production *de novo* de corps lipidiques est un aspect important de la biologie des corps lipidiques et les différencie d'autres organelles qui se multiplient généralement par auto-réplication.

La mobilisation des lipides est un autre aspect important de la biologie des corps lipidiques. En particulier, deux voies existent, celle de la lipolyse et celle de l'autophagie. Dans ces interactions, les enzymes permettant l'hydrolyse des lipides neutres se trouvent proches des corps lipidiques afin de pouvoir accéder directement à leur contenu. La section 2.4.2 présente plus en détail ces aspects.

Les interactions des corps lipidiques avec d'autres organelles font généralement intervenir des protéines spécifiques à chaque interaction. Gao et Goodman proposent une revue des interactions des corps lipidiques, [Gao and Goodman, 2015] qui montre que les découvertes en lien avec ces interactions sont relativement récentes. Elles concernent principalement l'interaction avec le réticulum, pour l'ancrage et la production de lipides neutres, la lipolyse, faisant intervenir des lipases et des protéines de régulation, et enfin la fusion de corps lipidiques. La présence de ces protéines et mécanismes implique une

certaine spécificité des interactions pour chaque tissu et met en évidence la complexité de la biologie des corps lipidiques.

2.3.2 Autres interactions

Des travaux récents ont mis en évidence des interactions plus diverses des corps lipidiques dont une partie reste encore mal comprise.

Parmi les autres interactions et fonctions des corps lipidiques, on retrouve notamment :

- La présence de corps lipidiques dans le noyau. On suppose que les corps lipidiques présents à l'intérieur du noyau permettent la régulation du métabolisme des lipides du noyau ainsi que l'échange de protéines. Ce type d'interactions soulève de nombreuses questions sur le rôle exact des corps lipidiques nucléaires, [Farese and Walther, 2016, Ohsaki et al., 2016].
- Les corps lipidiques présents dans les feuilles de certaines plantes permettent la production de composés actifs luttant contre des champignons, [Shimada and Hara-Nishimura, 2015].
- L'accumulation de corps lipidiques dans des neurones a été observée en lien avec plusieurs pathologies comme les maladies de Huntington ou de Parkinson, [Welte, 2015].
- L'interaction avec des pathogènes a été constatée. En particulier, certaines protéines intervenant dans l'assemblage de virus comme le virus de l'hépatite C, peuvent être localisées au niveau de la surface des corps lipidiques. La présence de protéines antivirales, comme la vipérine, présente généralement sur le réticulum endoplasmique, a été observée au niveau des corps lipidiques, [Welte, 2015].
- Les corps lipidiques peuvent abriter des protéines (notamment les histones, qui sont des protéines associées aux noyaux des cellules eucaryotes) et ainsi empêcher leur dégradation et garantir une conservation sur de longues périodes, [Welte, 2015].

Les corps lipidiques sont généralement plutôt immobiles [Walther and Farese Jr, 2009] bien qu'ils puissent se déplacer rapidement sur de petites distances. Le mouvement coordonné vers les bords de la cellule sur des microtubules par des moteurs moléculaires a été observé et pourrait avoir un lien avec la fusion de corps lipidiques [Fujimoto and Parton, 2011]. Le transport des corps lipidiques et son influence sur l'utilisation des lipides a été observé à plusieurs reprises sur différents organismes et la question de son importance et de son caractère universel reste ouverte [Walther and Farese Jr, 2009].

2.3.3 Les corps lipidiques dans différents tissus

En général, les tissus adipeux présentent un unique corps lipidique de très grande taille et les périlipines sont les protéines les plus représentées parmi la centaine de protéines identifiées. Ces protéines ont un rôle principalement dans la régulation de la lipolyse. Certains mécanismes d'attachement au réticulum endoplasmique ou des protéines en lien avec la fusion de corps lipidiques ont été identifiées [Jambunathan et al., 2011]. En revanche, dans les graines, les corps lipidiques sont souvent plus petits et très nombreux. Les protéines les plus représentées, parmi environ une douzaine, sont les oléosines qui ont un rôle sur la stabilité et impactent peu la lipolyse. Il existe aussi une variété de fonctions chez les plantes. En effet, les corps lipidiques des fruits ou des feuilles, généralement plus gros que ceux des graines, ont un rôle dans la production d'antifongiques.

2.4 Stockage et mobilisation des lipides

Nous avons vu dans les sections précédentes que les corps lipidiques sont des structures uniques dans le monde vivant et très conservées entre les différents règnes. Cette section vise à montrer que les corps lipidiques sont des organes dynamiques et non pas inertes qui évoluent sous l'action de mécanismes entraînant des modifications dans les modes de stockage et de mobilisation des lipides. Les phénomènes dynamiques en jeu ne sont pas nécessairement identiques entre les espèces ni même entre les tissus d'un même organisme.
Cette section traite de la stabilité des corps lipidiques puis aborde les mécanismes de mobilisation des lipides et leurs liens avec la morphologie des corps lipidiques. La compréhension de ces processus permet d'apporter des éléments essentiels pour la biologie des corps lipidiques et pour le traitement des pathologies en lien avec les corps lipidiques ainsi que pour l'amélioration des rendements d'extraction des huiles végétales.

2.4.1 Stockage et déstabilisation des corps lipidiques

Les corps lipidiques présentent des compositions, des tailles, des morphologies et des distributions différentes à la fois entre les règnes et les tissus mais aussi au cours du temps, malgré leur structure commune chez les organismes vivants. Ceci peut s'expliquer par la conjonction de phénomènes de production de lipides neutres et par les phénomènes de stabilité déjà mentionnés. Le nombre de corps lipidiques et leurs tailles peuvent être affectés par différents phénomènes qui, régulés différemment entre les différents règnes ou tissus, expliquent l'hétérogénéité observée. Cette section présente les différents mécanismes de synthèse locale, coalescence, mûrissement et fission. La figure 2.2 schématise l'impact de ces mécanismes sur une population de corps lipidiques.

Synthèse locale

Il a été observé que certains corps lipidiques de cellules animales voyaient leur taille augmentée au cours du temps, en raison de la relocalisation au niveau de la membrane du corps lipidique d'enzymes catalysant la synthèse de lipides neutres, [Wilfling et al., 2013]. Ce mécanisme conduit à une croissance du volume du corps lipidique linéaire avec le temps, [Thiam et al., 2013]. Il est clair que ce phénomène conduit à des corps lipidiques plus gros mais n'affecte pas leur nombre.

Coalescence

De part leur structure d'émulsion, les corps lipidiques sont sujet à déstabilisation par coalescence. La composition de la membrane en protéines et en phospholipides influe sur la stabilité des corps lipidiques en créant une barrière d'énergie qui s'oppose à un changement de forme. La forme sphérique des corps lipidiques implique l'existence d'une surpression à l'intérieur de la membrane qui favorise la déstabilisation des corps lipidiques. La coalescence de deux corps lipidiques se produit lorsqu'ils se rapprochent, réduisant le film aqueux qui les sépare. A ce stade, un pore peut s'ouvrir et conduire à la fusion des deux membranes s'il reste stable suffisamment longtemps [Thiam et al., 2013]. Les pores n'ont jamais été observés directement même si certain travaux suggèrent que le pore pourrait être stabilisé par l'action de protéines [Jüngst et al., 2013]. Le processus de coalescence conduit à des corps lipidiques plus gros mais moins nombreux. De fait, il minimise la

surface exposée et tend vers l'équilibre des pressions à l'intérieur des corps lipidiques et du cytosol.

Des événements de fusion ont été observés à plusieurs reprises [Miquel et al., 2014, Jüngst et al., 2013]. Il reste cependant difficile de quantifier réellement leur importance ainsi que les mécanismes qui régulent la fusion. Il apparaît cependant clair que les protéines du corps lipidique ont un impact fort sur la taille des corps lipidiques et donc probablement sur la régulation du phénomène de fusion. Dans les cellules animales, des protéines comme fsp27 semblent favoriser les phénomènes de fusion. Chez les plantes n'exprimant pas certaines oléosines, les corps lipidiques sont plus gros, probablement en raison de fusion plus fréquentes, [Shimada et al., 2008]. Ce phénomène est aussi observé sur des corps lipidiques reconstitués, [Peng et al., 2003]. Chez *A. thaliana* en particulier, la fusion de corps lipidiques a été observée par microscopie confocale dynamique, [Miquel et al., 2014].

Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est un processus par lequel les plus petites gouttes d'émulsion disparaissent progressivement au profit de gouttes plus grosses. Le transfert de matière d'une goutte à l'autre se fait à travers la phase continue de l'émulsion ou bien à travers de petites micelles. Ce mécanisme, régulé par les différences de pression interne entre les gouttes et la solubilité des molécules dans la phase continue, conduit à une croissance du volume de la goutte receveuse linéaire avec le temps. Un phénomène similaire, celui de la perméation, conduit à une croissance du carré du rayon linéaire avec le temps et nécessite la formation d'un canal entre les deux gouttes.

La stabilité dans le temps des corps lipidiques suggère que le mûrissement d'Ostwald doit être un mécanisme activé, par exemple par la lipolyse, qui favorise la formation de micelles. Peu d'informations sont disponibles pour le mûrissement des corps lipidiques en raison des difficultés techniques liées à son observation par microscopie, [Thiam et al., 2012]. Le temps de croissance des gouttes est une des différences principales entre le mûrissement d'Ostwald et la coalescence. Dans le premier cas, les gouttes croissent lentement (quelques minutes ou heures) alors que dans le second, la croissance est très rapide (quelques secondes). En revanche, comme la coalescence, ce mécanisme réduit le nombre de corps lipidiques et produit des corps lipidiques plus gros.

Fission

La fission correspond à la division d'un corps lipidique en deux corps lipidiques plus petits. Ce phénomène a été observé lors de la division cellulaire de la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, [Long et al., 2012], et est régulièrement évoqué pour expliquer la création de corps lipidiques de petite taille lors de phases de lipolyse, [Walther and Farese Jr, 2009]. Contrairement à la fusion, la fission a pour conséquence d'augmenter le nombre de corps lipidiques et la surface exposée. L'importance de ce phénomène, analogue à la fission des mitochondries, ainsi que sa régulation, doivent encore être clairement élucidées.

2.4.2 Mobilisation des ressources lipidiques

Pour maintenir son flux métabolique, la cellule stocke des lipides neutres dans les corps lipidiques et les mobilise pour pallier un défaut de carbone ou d'énergie. Là encore,

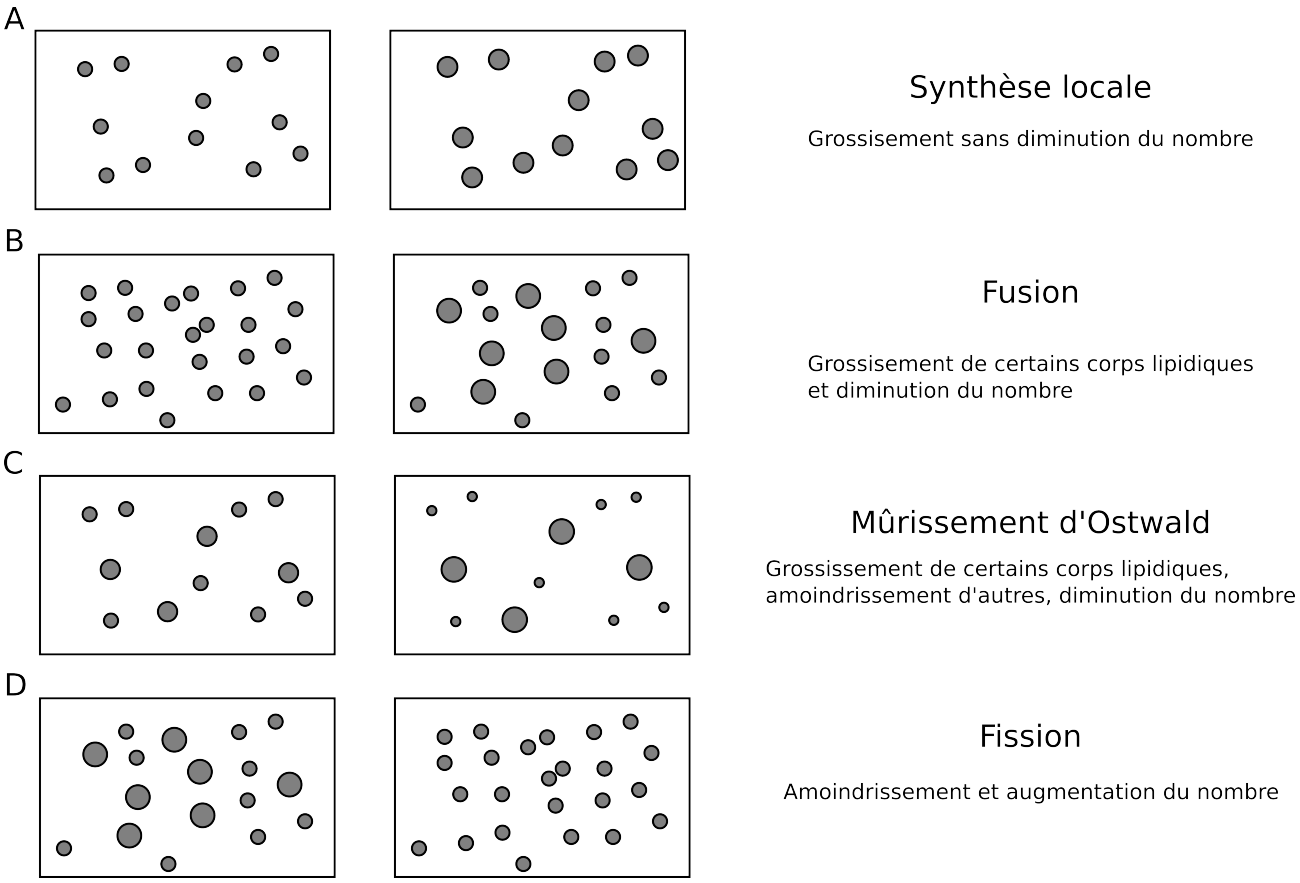


FIGURE 2.2 – Impact des différents mécanismes de déstabilisation sur une population de corps lipidiques. A - Synthèse locale, B - Coalescence, C - mûrissement d'Ostwald, D - Fission.

il existe plusieurs phénomènes qui peuvent se manifester différemment en fonction des tissus considérés. La taille et la composition de la membrane des corps lipidiques jouent un rôle fondamental dans la capacité de la cellule à mobiliser efficacement les lipides. Cette section propose une présentation des deux mécanismes de mobilisation des lipides neutres : la lipolyse et la lipophagie.

Lipolyse

La lipolyse correspond à la dégradation des triacylglycerols en acides gras libres. La dégradation se fait en trois étapes : hydrolyse en diacylglycerol puis en monoacylglycerols et enfin en acides gras. Les protéines responsables de l'hydrolyse sont appelées lipases. Il existe différentes lipases en fonction des tissus considérés. De même, la lipolyse prend différentes formes chez les plantes ou dans les tissus adipeux des mammifères, [D'Andrea, 2015, Thiam et al., 2013].

Dans les tissus adipeux des mammifères, il existe une lipolyse basale faible qui fait intervenir ATGL (adipose triglyceride lipase), une lipase qui permet de transformer les triacylglycerols et diacylglycerol. Cette lipolyse est à un niveau très faible en raison de l'inhibition par les périlipines de protéines activant la lipolyse et/ou par l'encombrement stérique induit par leur présence à la surface des corps lipidiques. La lipolyse est activée par un réseau de signalisation qui induit la désinhibition d'ATGL et la fixation à la surface du corps lipidique de HSL (hormone sensitive lipase), une lipase située dans le cytosol durant la phase basale. Cette lipase entraîne la dégradation de diacylglycerol en monoacylglycerols. Enfin, MGL (monoacylglycerol lipase), une lipase cytosolique, produit des acides gras libres et du glycerol à partir du monoacylglycerol.

Dans les graines, les oléosines empêchent la lipolyse pendant la phase quiescente en isolant les triacylglycerols des lipases SDP1 (sugar dependant 1), localisées à la surface des peroxysomes, des organelles spécialisées dans la dégradation de certaines molécules. Dans la phase dynamique, les oléosines sont retirées de la surface des corps lipidiques et dégradées, ce qui permet la fixation de SDP1 et le début de la dégradation des triacylglycerols, [Graham, 2008, Thazar-Poulot et al., 2015]. Les étapes de la lipolyse sont moins bien connues dans les graines que dans les tissus adipeux.

La lipolyse entraîne une diminution du volume des corps lipidiques, en raison de la consommation de triacylglycerols. Elle entraîne aussi une densité plus importante de phospholipides à la surface des corps lipidiques. Ce phénomène peut entraîner l'activation de phénomènes de mûrissement au cours desquels les corps lipidiques devenant plus petits transfèrent leurs contenus à des corps lipidiques plus gros. La présence d'une forte proportion de diacylglycerol, qui peuvent être localisés à la surface des corps lipidiques entraîne un abaissement de la tension de surface et peut conduire à la formation de micelles ou à des phénomènes de fission, [Thiam et al., 2013, Long et al., 2012].

De nombreux aspects de la mobilisation des lipides neutres restent encore mal connus, particulièrement chez les plantes et dans les tissus non spécialisés dans l'accumulation de lipides. Cependant, certains travaux suggèrent que la maîtrise de la lipolyse chez les plantes pourrait permettre d'augmenter significativement les rendements d'extraction des huiles végétales, [D'Andréa et al., 2007, Kelly et al., 2013].

Lipophagie

Plusieurs protéines en lien avec l'autophagie, un mécanisme de dégradation du contenu cellulaire, ont été observées autour des corps lipidiques. L'autophagie des corps lipidiques, appelée lipophagie, correspond à l'encapsulation du corps lipidique dans un autophagosome qui fusionne avec une organelle contenant des enzymes qui peuvent hydrolyser les lipides neutres et des protéases capables de dégrader les protéines du corps lipidique. Ce mécanisme, tout comme la lipolyse, libère des acides gras. Il soulève cependant un certain nombre de questions, portant sur sa régulation et les mécanismes de reconnaissance des corps lipidiques par la machinerie de l'autophagie, [Thiam et al., 2012, Welte, 2015, Fujimoto and Parton, 2011].

2.5 Formation des corps lipidiques

L'origine des corps lipidiques est un sujet très étudié mais bon nombre de questions restent ouvertes. Les réseaux de synthèse des lipides neutres et de nombreuses interactions ont été largement documentés, cependant, les modèles proposés pour la formation des corps lipidiques restent encore peu détaillés sur les mécanismes à l'œuvre et en particulier sur le rôle des protéines du corps lipidique.

Cette section détaille la synthèse des lipides neutres et l'interaction entre la synthèse des lipides neutres et les protéines. Une présentation des différents modèles de formation des corps lipidiques est ensuite exposée.

2.5.1 Synthèse de lipides neutre et de protéines

La formation des corps lipidiques nécessite la coordination de plusieurs voies métaboliques. En effet, il est nécessaire d'activer les voies en lien avec la synthèse des lipides neutres, c'est-à-dire l'ensemble des réactions qui produisent des triacylglycerols à partir d'acides gras, la production des protéines des corps lipidiques, le remodelage et la synthèse de phospholipides (cycle de Lands et voie de Kennedy), [Pol et al., 2014]. Ces différentes voies sont plutôt bien connues mais la formation de corps lipidiques, la régulation de leurs tailles, de leurs compositions, de leur géométrie et leur libération dans le cytosol font intervenir des mécanismes hypothétiques qu'il est difficile de confirmer en raison des problèmes posés par l'observation des processus dynamiques à cette échelle.

2.5.2 Localisation et interactions

Il est admis que les corps lipidiques naissent au niveau du réticulum endoplasmique chez les eucaryotes. La synthèse des lipides neutres a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, certaines protéines des corps lipidiques peuvent être localisées à la fois à leur surface et sur la membrane du réticulum. Chez les bactéries, en revanche, la formation des corps lipidiques se fait principalement au niveau de la membrane plasmique. Les mécanismes moléculaires qui régulent la localisation précise des corps lipidiques en formation sur le réticulum sont mal connus. On suppose cependant, que le recrutement des protéines a lieu à ce stade [Thiam and Forêt, 2016]. La formation des corps lipidiques nécessite la formation de domaines spécifiques au sein de la membrane du réticulum endoplasmique, dans lesquels les lipides neutres vont s'accumuler pour former le futur corps

lipidique. Le recrutement de certaines protéines, comme les oléosines ou les périlipines, ou d'un certain type de phospholipides peut réguler la formation des corps lipidiques. Des mécanismes de séparation de phase ont été avancés pour expliquer ces phénomènes [Zanghellini et al., 2010, Thiam and Forêt, 2016]. Le corps lipidique se forme suite à l'accumulation de lipides neutres à l'intérieur de la membrane du réticulum qui la déforme jusqu'à obtenir une forme sphérique qui se détache du réticulum et se localise dans le cytosol, voir figure 2.3.

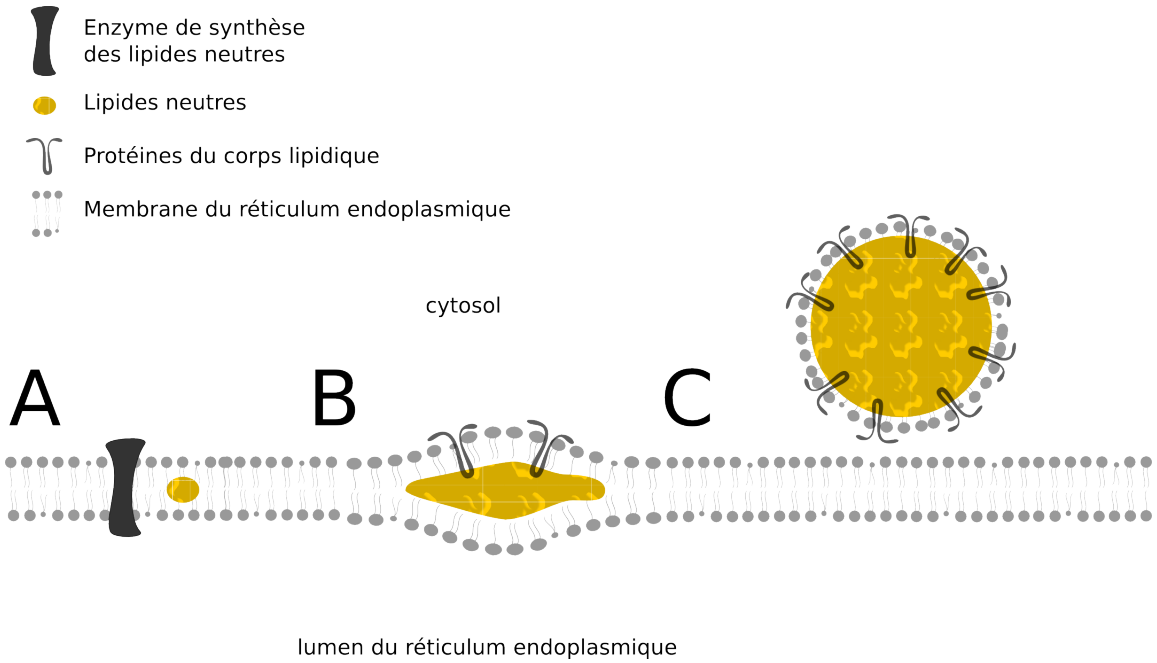


FIGURE 2.3 – Étapes de la formation *de novo* de corps lipidiques. A - Synthèse de lipides neutres, B - Accumulation de lipides neutres et de protéines, C - Migration du corps lipidique dans le cytosol.

2.5.3 Modèles de formation *de novo*

Plusieurs modèles sont proposés pour expliquer les mécanismes de formation des corps lipidiques. Ils ont tous en commun l'accumulation de lipides neutres et de protéines au niveau du réticulum endoplasmique, [Thiam et al., 2012, Pol et al., 2014, Murphy and Vance, 1999, Ploegh, 2007, Robenek et al., 2006]. Une rapide présentation de ces modèles est donnée dans la suite.

Bourgeonnement

Ce modèle est le plus couramment cité pour expliquer la formation des corps lipidiques. Dans ce modèle, les lipides neutres s'accumulent sur un site précis, induisant une déformation de la membrane jusqu'à produire le bourgeonnement d'un corps lipidique. Certaines variantes de ce modèle suggèrent que le bourgeon reste lié à la membrane du réticulum alors que d'autres proposent une séparation complète. La formation de domaines spécifiques et l'interaction des protéines présentes dans le cytosol sont supposées influer sur le mécanisme de bourgeonnement. Dans ce modèle, les lipides neutres diffusent depuis le site de synthèse jusqu'à un corps lipidique naissant.

Une version particulièrement détaillée de ce modèle a été proposée dans [Thiam and Forêt, 2016]. Le chapitre 3 présente un modèle de membrane partiellement issu de ce modèle.

Bicelle

Ce modèle propose la formation de corps lipidiques par excision d'une lentille formée de la membrane du réticulum endoplasmique et des lipides neutres agrégés, [Ploegh, 2007]. L'un des avantages de ce modèle est qu'il permet d'expliquer la formation de corps lipidiques sans avoir recours à des mécanismes liés à des protéines spécifiques.

Bourgeonnement vésiculaire

Le modèle de bourgeonnement vésiculaire suggère que les corps lipidiques sont initialement formés dans de petites vésicules dans des domaines spécifiques du réticulum endoplasmique. Les mécanismes classiques de formation des vésicules par des couches de protéines déformeraient une partie de la membrane du réticulum qui se remplirait simultanément de lipides neutres. Le corps lipidique serait ensuite détaché de la membrane du réticulum qui se reformerait en joignant les extrémités détachées.

2.6 Synthèse des enjeux scientifiques en lien avec les corps lipidiques

Cette section récapitule les enjeux scientifiques liés à la compréhension de la biologie des corps lipidiques et inscrit la thèse dans ce contexte. Elle détaille notamment l'état d'avancement des recherches et précise les questions qui seront abordées dans les chapitres suivants.

2.6.1 Mécanismes biophysiques de la vie des corps lipidiques

Depuis quelques dizaines d'années et grâce au développement de la microscopie et des techniques d'observation ainsi que des biotechnologies, il a été possible de mettre en évidence de nombreux phénomènes en lien avec la formation et le développement des corps lipidiques. C'est dans ce contexte que de nombreux mécanismes et modèles ont été avancés pour tenter d'expliquer les observations sur la lipolyse, la formation *de novo* de corps lipidiques, le rôle des protéines des corps lipidiques comme les oléosines ou les périlipines. En particulier, il ressort que d'une part en raison de la structure conservée des corps lipidiques, et d'autre part en raison du rôle avéré et souvent similaire de ces protéines, des mécanismes communs issus de concepts biophysiques ont été avancés pour tenter d'expliquer les observations.
L'introduction de la physique de la matière molle dans [Thiam et al., 2013], en particulier les concepts de physique des émulsions, est une avancée qui permet de mieux décrire les mécanismes et en particulier l'influence de protéines localisées à la surface des corps lipidiques. De même, ces concepts donnent un cadre théorique qui permet une meilleure description des mécanismes à l'œuvre et qui synthétise les aspects communs à tous les corps lipidiques.

Dans la thèse, on se propose d'utiliser un modèle issu de la physique de la matière molle pour expliquer les mécanismes de bourgeonnement des corps lipidiques. Ce modèle, assez

proche du modèle de bourgeonnement présenté précédemment, considère la membrane du réticulum endoplasmique comme une interface fluide et élastique régit par la tension de surface et la rigidité. Ce modèle théorique présente une phénoménologie très riche et très proche des observations sur les systèmes vivants. De plus amples détails sur la biophysique des membranes et le modèle en lui-même seront donnés dans le chapitre 3.

2.6.2 Observation des corps lipidiques

Le développement de méthodes d'observation, en particulier la microscopie a permis depuis de très nombreuses années de mieux appréhender la biologie des corps lipidiques. En particulier, l'évolution récente des techniques d'imagerie confocale a permis d'observer à plusieurs reprises des événements de fusion, [Miquel et al., 2014, Jambunathan et al., 2011].
Le rôle de la fusion a été détaillé par de nombreux auteurs [Thiam et al., 2013, Walther and Farese Jr, 20 mais la régulation des événements de fusion est encore mal connue.
L'évolution des techniques d'imagerie a produit des images qu'il est nécessaire de savoir traiter de façon systématique et robuste pour pouvoir en tirer toute l'information disponible.

Dans la thèse, nous proposons de mettre en place une procédure systématique de suivi dynamique des corps lipidiques dans des images de microscopie confocale dans le but de détecter des événements de fusion. Le chapitre 4 présente des techniques d'analyse d'image pour détecter des corps lipidiques dans des piles d'images 3D dynamiques et une méthode pour détecter systématiquement des événements de fusion chez différents embryons d'*A. thaliana*.

2.6.3 Compréhension du rôle des protéines

Les protéines associées aux corps lipidiques ont clairement un rôle majeur sur de nombreux aspects de la vie des corps lipidiques. Cependant, les mécanismes précis et quantifiés décrivant le rôle à associer à chaque protéine restent assez rares, en particulier chez les plantes.
Il a été observé à de nombreuses reprises que les protéines du corps lipidique avaient une influence sur sa stabilité. En particulier, il a été suggéré de nombreuses fois que les protéines à la surface des corps lipidiques régulaient la coalescence. Seuls quelques travaux de modélisation ont tenté de donner des pistes sur l'importance réelle de la fusion dans la vie du corps lipidique [Boschi et al., 2017, Trigui, 2014].

Dans le chapitre 5, des méthodes permettant, à partir d'images de microscopie confocale statique, d'estimer les taux de fusion et de comparer différents mutants d'oléosines chez *A. thaliana* sont développées. En particulier, on cherchera à comparer l'influence des oléosines sur la coalescence des corps lipidiques en utilisant les distributions de tailles observées par microscopie ainsi qu'un modèle dynamique de coalescence. L'estimation des paramètres du modèle de coalescence permet de mettre en place des tests statistiques pour comparer les taux de fusion pour différents embyrons d'*A. thaliana*.

Chapitre 3

Biophysique des corps lipidiques et bourgeonnement

Contents

3.1 Physique des membranes biologiques 35
3.1.1 Phénomènes d'interface 35
Tension de surface 35
Pression de Laplace 36
Mouillage 36
Tensioactifs 38
Émulsions 38
Autoassemblage et séparation de phase 38
3.1.2 Membranes biologiques 39
Composition chimique et structure 39
Tension et propriétés élastiques 39
Fluctuations 40
Bourgeonnement 40
3.1.3 Modélisation des membranes biologiques 42
Généralités 42
Modèles continus 42
Cas des petites déformations 43
Cas des membranes axisymétriques 44
3.2 Un modèle de formation des corps lipidiques 44
3.2.1 Les phénomènes physiques de la formation des corps lipidiques 45
Nucléation 45
Croissance 46
Bourgeonnement 46
3.2.2 Modèle de bourgeonnement et équation de la forme 47
Énergie libre 47
Terme intégral 51
Terme de bord 51
Problème d'optimisation 52
3.2.3 Résolution numérique 52
Méthode de tir 53

Méthodes numériques 54
Aspects techniques de la résolution numérique 55
3.3 Résultats 56
3.3.1 Modèle avec monocouches identiques et bicouche infiniment rigide 57
3.3.2 Modèle complet 60
Étude de stabilité 60
Effet de la rigidité 63
3.3.3 Modèle avec monocouches différentes et bicouche infiniment rigide 64
3.3.4 Tension de ligne 65
3.3.5 Courbure spontanée 66
3.3.6 Différences de pressions 67
3.3.7 Interprétation des résultats 67

Ce chapitre présente un modèle de bourgeonnement des corps lipidiques. Il commence par une section de rappel des concepts de la physique des interfaces en lien avec la formation des corps lipidiques. La section suivante présente un modèle de bourgeonnement faisant intervenir les membranes entourant les corps lipidiques en formation. Enfin, les résultats de ce modèle sont présentés et commentés. Ce travail, en collaboration avec A.R. Thiam et L. Forêt du Laboratoire de Physique Statistique de l'École Normale Supérieure, a fait l'objet d'une publication dans *Biophysical Journal*, [Deslandes et al., 2017].

3.1 Physique des membranes biologiques

Les phénomènes d'interfaces sont par nature universels et on les retrouve dans de nombreux domaines de la vie courante, dans l'industrie et dans des phénomènes naturels. Une très riche phénoménologie découle de l'existence d'interfaces entre des milieux de natures différentes. La compréhension des phénomènes d'interface est souvent d'intérêt majeur dans les systèmes vivants, particulièrement pour l'étude des corps lipidiques [Thiam et al., 2013]. Cette section présente les principaux concepts en lien avec l'étude de la physique de ces interfaces et de leur utilisation dans le cas de l'étude des membranes biologiques.

3.1.1 Phénomènes d'interface

Tension de surface

Les molécules au sein d'un liquide s'attirent et bénéficient d'interactions avec leurs voisines qui les «satisfont». La présence d'une interface avec l'air implique qu'une partie de ces molécules perdent une partie de leurs interactions cohésives, elles sont «insatisfaites». Le défaut d'énergie des molécules à l'interface conduit à la définition d'une tension de surface. Si U est l'énergie de cohésion d'une molécule à l'intérieur d'un liquide, une molécule à la surface du liquide aura une énergie d'environ $\frac{U}{2}$, ce qui conduit à une tension de surface $\sigma \sim \frac{U}{2a^2}$, où a^2 représente la surface exposée par la molécule.

L'origine de la tension est différente pour les interfaces entre deux liquides. Dans ce cas, les molécules à l'interface sont attirées par les molécules de leurs phases respectives et repoussées par les molécules de l'autre phase. Dans le cas des membranes biologiques, les phospholipides sont situés à l'interface et la tension a pour origine principale l'interaction des têtes polaires des lipides avec les molécules des deux phases. La présence des phospholipides à l'interface entraîne une forte diminution de la tension par rapport à une interface sans lipides.

La tension de surface est une grandeur macroscopique dont l'origine est moléculaire. On la définit comme l'énergie à fournir pour augmenter la surface d'une unité.

La tension de surface a un rôle dans de nombreux phénomènes de la biologie des corps lipidiques, notamment la coalescence des corps lipidiques ou le mûrissement d'Ostwald, [Thiam et al., 2012]. Dans la suite, on présente un modèle de bourgeonnement des corps lipidiques qui fait intervenir la tension de surface.

Pression de Laplace

La tension de surface conduit à des interfaces courbes et entraîne donc des différences de pressions entre les deux milieux séparés par l'interface. On peut calculer aisément la valeur de la différence de pression pour une goutte sphérique avec une pression interne p_i, un volume V_i (respectivement p_e et V_e pour les volumes et pressions extérieurs) et une tension σ, par la méthode des travaux virtuels, comme suggéré dans [de Gennes et al., 2002] :

$$\delta W = -P_i dV_i - P_e dV_e + \sigma dA$$

Pour une variation dR du rayon de la goutte, on aura les relations suivantes :

$$dV_i = 4\pi R^2 dR = -dV_e$$
$$dA = 8\pi R dR$$

Ainsi, la différence de pression s'exprime en fonction du rayon de la goutte et de la tension :

$$\Delta p = p_i - p_e = \frac{2\sigma}{R} \tag{3.1}$$

Le résultat général, démontré par Laplace en 1805, pour une surface quelconque donne :

$$\Delta p = P_e - P_i = \sigma C \tag{3.2}$$

Où $C = \frac{1}{R} + \frac{1}{R'}$ est la courbure de l'interface définie à partir de R et R' les rayons de courbure de la surface, comme définis sur la figure 3.1.

La pression de Laplace est à l'origine de nombreux phénomènes déjà mentionnés dans le chapitre 2 comme le mûrissement d'Ostwald ou la coalescence de gouttes.

Mouillage

Le mouillage correspond à l'étalement de liquides déposés sur des substrats solides. On considère une goutte de liquide posée sur un substrat solide, comme indiqué sur la figure 3.2, et on cherche à déterminer si le liquide s'étale ou non sur le solide. Trois tensions de surface sont donc à l'œuvre : σ_1 entre le solide et le liquide, σ_2 entre le liquide et l'air et σ entre l'air et le solide. On définit alors le paramètre d'étalement de la façon suivante :

$$S = \sigma_2 - (\sigma_1 + \sigma) \tag{3.3}$$

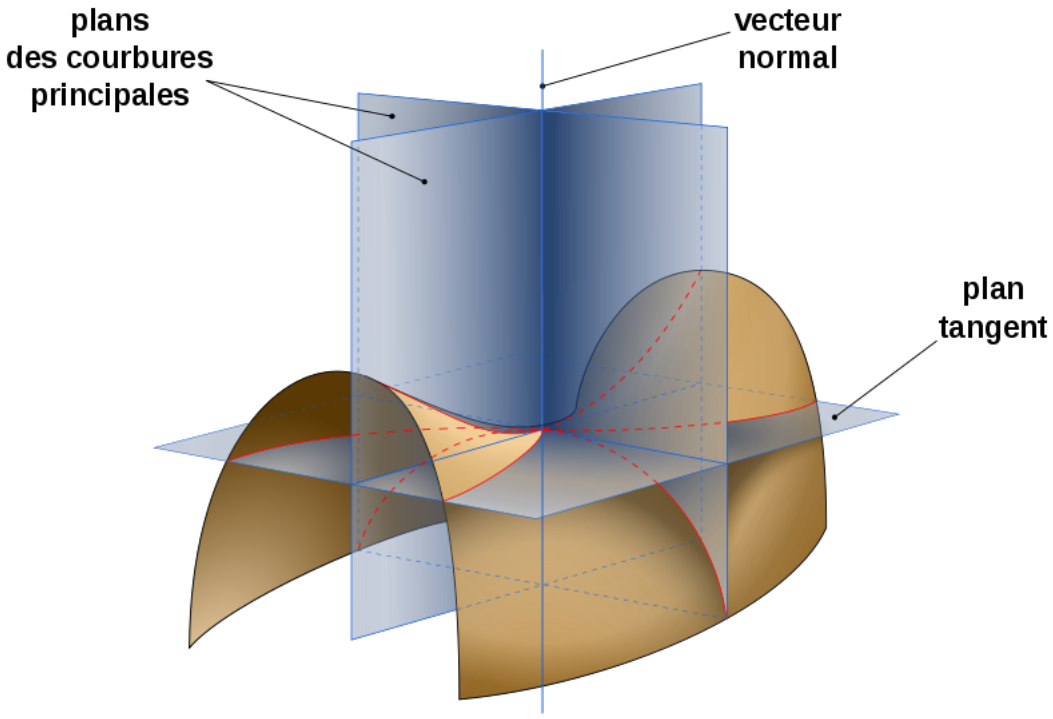


FIGURE 3.1 – Les rayons de courbure d'une surface sont définis à partir de deux plans normaux se coupant selon la direction normale à la surface. Les intersections de la surface avec chacun des plans définissent deux courbes dont les rayons de courbure sont R et R'. Figure d'Eric Gaba.

Ce paramètre correspond à la différence d'énergie entre le solide sec et le solide mouillé. Lorsque ce paramètre est positif, le liquide s'étale et mouille complètement le solide. Dans le cas contraire, le liquide forme une calotte sphérique dont l'angle θ est donné par la relation de Young [Young, 1805] :

$$cos\theta = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\sigma} \tag{3.4}$$

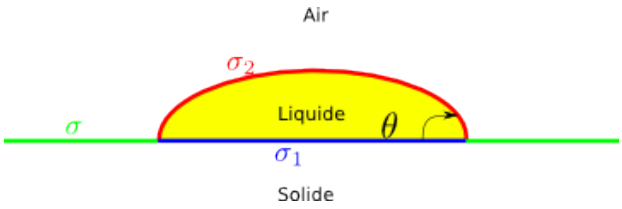


FIGURE 3.2 – Mouillage avec un substrat solide.

Le retrait spontané d'un film liquide est appelé démouillage. Ce phénomène est analogue aux phénomènes de transition de phase. En effet, un film métastable peut démouiller par nucléation et croissance de zones sèches. Le démouillage est aussi observé lorsque le film est instable.

Le mouillage à une interface liquide-liquide présente de fortes analogies avec le problème de la formation des corps lipidiques. Dans cette situation, une goutte d'un liquide C se trouve à l'interface entre deux autres phases liquides, notée A et B. La figure 3.3 présente cette situation. Les interfaces ont alors des tensions σ_{AB}, σ_{AC} et σ_{BC}, déterminées par les interactions entre les composants des phases en contact. Dans le cas d'un

mouillage partiel, le contact entre les trois phases se fait avec un angle θ, déterminé par l'équivalent de la loi d'Young [Thiam and Forêt, 2016] :

$$cos\theta = \frac{\sigma_{AB}^2 - \sigma_{AC}^2 - \sigma_{BC}^2}{2\sigma_{AB}\sigma_{BC}} \tag{3.5}$$

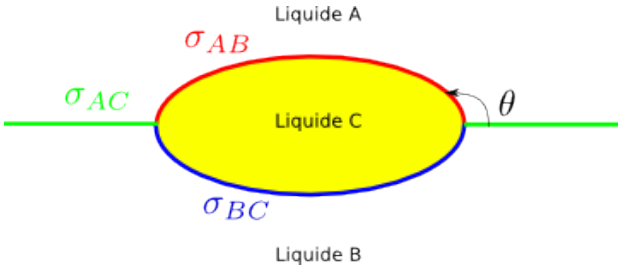


FIGURE 3.3 – Mouillage à l'interface liquide-liquide.

Tensioactifs

Les tensioactifs sont des composés qui, lorsqu'ils se trouvent à l'interface, réduisent la tension de surface et empêchent les fluctuations thermiques de surface, stabilisant ainsi la surface. En général, les tensioactifs possèdent deux parties ayant chacune une affinité pour l'une des deux phases. Les parties hydrophobes, qui ne se mélangent pas à l'eau sont généralement des chaînes aliphatiques $CH_3(CH_2)_n$ et les parties hydrophiles sont des ions ou des chaînes neutres miscibles dans l'eau.
Les lipides des membranes des corps lipidiques sont des tensioactifs. De même, certaines protéines présentes dans des systèmes vivants ont une préférence pour les interfaces et peuvent abaisser l'énergie de l'interface.

Émulsions

Les émulsions sont des systèmes à trois composants métastables. Elles sont composées d'une phase organique, d'une phase aqueuse et de tensioactifs. Les tensioactifs forment une monocouche autour d'une goutte formée de l'une des deux phases. En général, les émulsions forment des systèmes de gouttes bien séparées. Ce système n'est pas stable et il en résulte un réarrangement constant et spontané des gouttes qui tend à minimiser les interfaces. Les corps lipidiques sont des émulsions [Thiam et al., 2012] et sont seulement métastables. Ainsi, les corps lipidiques sont soumis aux mêmes phénomènes que les émulsions, notamment à la coalescence.

Autoassemblage et séparation de phase

L'autoassemblage moléculaire correspond à l'assemblage spontané de molécules en structures complexes. Les micelles et les membranes biologiques sont le résultat d'autoassemblage de phospholipides (voir figure 3.4). L'autoassemblage peut survenir lorsque les molécules ont une énergie plus faible dans l'assemblage que dans l'état dispersé et si la concentration est supérieure à une concentration critique.
De façon similaire, la séparation de phase dans un mélange à deux composés peut survenir si la concentration est supérieure à une concentration critique et si l'état dispersé est défavorable énergétiquement. Ce type de phénomène conduit à la formation de gouttes (huile dans eau par exemple) ou de bulles (gaz dans eau).

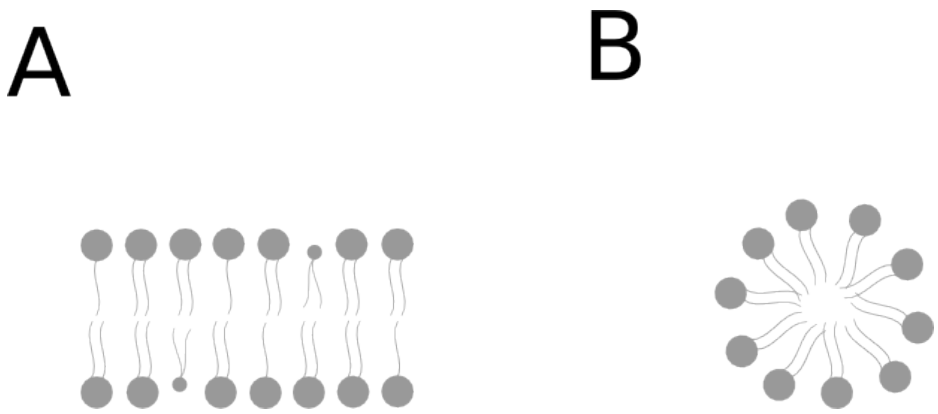


FIGURE 3.4 – A - Membrane plane composée de phospholipides. B - Micelle composée de phospholipides.

3.1.2 Membranes biologiques

Les membranes biologiques sont des structures essentielles à la biologie. Elles servent à isoler la cellule ou des organites à l'intérieur de la cellule et ont aussi un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus biologiques. En tant qu'interfaces, elles sont soumises aux phénomènes décrits précédemment mais présentent des spécificités en lien avec la diversité des phénomènes biologiques. En effet, les interfaces formées par les membranes biologiques présentent une phénoménologie très riche, notamment en raison de la présence de protéines qui agissent comme régulateur ou moteur de processus comme la fusion de membranes, le bourgeonnement de vésicules, le transport, les échanges de composés chimiques ou encore la signalisation.

Composition chimique et structure

Chaque membrane biologique possède ses propres protéines et sa propre composition chimique qui influe sur ses fonctions. Cependant, d'une manière générale, elles forment un système fermé qui isole le lumen du cytosol. Cette interface forme généralement une bicouche composée de deux feuillets de phospholipides et de protéines. Les molécules qui composent les membranes s'assemblent spontanément en feuillets d'épaisseur égale à environ $4 - 6nm$. La membrane forme une barrière stable et imperméable maintenue simplement par les interactions hydrophobes entre les molécules qui la composent.

Les membranes biologiques sont composées principalement de trois types de molécules : les stérols, les sphingolipides et les phospholipides. Parmi ces molécules, on retrouve notamment des phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserines (PS), sphingomyeline (SM) et du Cholesterol (C), qui sont les composants principaux de la membrane des corps lipidiques (voir tableau 2.3). Ces molécules, qui sont des tensioactifs, sont composées d'une tête polaire hydrophile et d'une queue apolaire hydrophobe. Les propriétés géométriques de ces molécules et les protéines de la membrane ont un rôle fondamental sur sa forme, qui peut être plane, courbe, tubulaire ou sphérique.

Tension et propriétés élastiques

Les membranes biologiques sont soumises à une tension de surface qui provient de la nature moléculaire des phospholipides qui les composent. De nombreuses définitions de cette

tension, spécifiques aux membranes biologiques, ont été proposées [Kozlov and Chernomordik, 2015]. On donnera dans la suite des ordres de grandeurs des tensions de membranes biologiques (tableau 3.1). L'agencement des molécules qui composent la membrane a un fort impact sur les propriétés de la membrane, en particulier la tension. La présence d'une monocouche de phospholipides à l'interface entre une phase aqueuse et une phase organique réduit l'énergie de l'interface en limitant les interactions entre les molécules de chaque phase. Cependant, des interactions avec l'interface existent toujours, ce qui explique que la tension reste plus élevée que celle d'une bicouche isolant deux phases aqueuses.

Les membranes biologiques possèdent une certaine rigidité qui dépend, elle aussi, de la nature des molécules qui la composent. De plus, une asymétrie dans la composition des bicouches ou bien la présence de certaines molécules ou protéines favorise une certaine courbure à la membrane. Par exemple, PC possède une géométrie cylindrique et favorise les membranes planes tandis que PE une géométrie conique et favorise des membranes courbes. La géométrie des composants de la membrane peut être résumée par un paramètre appelé courbure spontanée qui correspond à la courbure adoptée par la membrane en l'absence de contrainte.

Comme mentionné précédemment, les membranes biologiques forment une interface et peuvent donc subir des déformations élastiques qui peuvent être de plusieurs types [Safran, 1994] :

— L'élongation et la compression sont des déformations liées à un changement de surface.

— Le cisaillement est une déformation qui affecte principalement les membranes non fluides.

— La courbure correspond au déplacement de la membrane hors de son plan de référence.

Dans de nombreux systèmes biologiques, l'élongation n'est pas prise en compte car les déformations de faible énergie font généralement intervenir seulement la courbure. Dans la suite, les membranes considérées sont fluides et on ne considère donc pas de phénomènes de cisaillement.

Fluctuations

La faible épaisseur des membranes les rend sensibles aux chocs induits par l'agitation thermique. Ces chocs entraînent des ondulations de l'interface qui sont à l'origine de nombreux phénomènes, comme par exemple l'ouverture transitoire de pores, des phénomènes de répulsion entre membranes (forces de Helfrich) et des transitions de formes [Lipowsky, 2013]. Les transitions entre des états métastables peuvent survenir lorsque la barrière d'énergie entre ces états est dépassée. Si la barrière d'énergie est de l'ordre des fluctuation thermiques, c'est à dire de l'ordre de K_bT (K_b est la constante de Boltzmann et T la température), la transition entre deux états métastables peut survenir spontanément.

Bourgeonnement

Les membranes cellulaires sont des objets dynamiques qui changent de forme lors des phases de division, fusion, croissance ou mouvement. Le bourgeonnement est un processus relativement universel qui permet la formation de domaines courbés généralement transitoires et en lien avec des phénomènes dynamiques comme le transport vésiculaire ou la

formation d'organelles par exemple [Hurley et al., 2010]. Les lipides membranaires ainsi que de nombreuses protéines jouent un rôle majeur pour former, stabiliser et/ou détecter des régions courbées dans les membranes.

L'assemblage des lipides membranaires en double feuillets impose généralement une certaine rigidité à la membrane et la déformation d'une telle membrane nécessite de dépasser une certaine barrière d'énergie, [Stachowiak et al., 2013]. Les processus de bourgeonnement spontanés sont rares car l'énergie nécessaire pour courber la membrane est largement supérieure à l'énergie thermique, [Hurley et al., 2010].

Plusieurs mécanismes sont utilisés dans les cellules pour déformer des membranes qui aboutissent principalement à des formes sphériques ou tubulaires. On les classe généralement en cinq catégories [McMahon and Gallop, 2005, Zimmerberg and Kozlov, 2006, Shen et al., 2012] :

— Asymétrie dans la composition lipidique des deux feuillets de la membrane. Certains lipides membranaires adoptent des géométries coniques qui favorisent la courbure de la membrane. La présence de tels lipides dans l'un des deux feuillets favorise la courbure de la membrane. La présence de protéines interagissant directement avec les lipides, comme les flipases (des protéines capables d'échanger des molécules entre les deux feuillets d'une membrane), peut induire de la courbure locale et ainsi contribuer à la formation de vésicules [Stachowiak et al., 2013].

— Présence de protéines intégrales. Certaines protéines intégrales adoptent aussi une conformation conique qui favorise la courbure de la membrane. Ce type de protéines favorise le bourgeonnement de vésicules et de tubes.

— Insertion d'hélices. Certaines protéines se lient à la membrane par des hélices amphiphatiques et favorisent localement la courbure de la membrane. Dans ce cas, la protéine adopte une forme d'hélice dont les parties hydrophobes se lient avec les parties polaires des lipides de la membrane. L'insertion de l'hélice dans l'un des feuillets de la membrane perturbe l'arrangement des têtes polaires et lipides et induit une déformation de la membrane [Zimmerberg and Kozlov, 2006].

— Assemblages de protéines. Certaines protéines s'assemblent pour former un manteau de protéines polymérisées courbé sur la membrane.

— Action de protéines du cytosquelette et de moteurs moléculaires. Le cytosquelette joue une rôle important sur la tension des membranes et la présence d'actine, une protéine du cytosquelette, peut induire des changements dans la tension des membranes et ainsi favoriser des déformations. Ce phénomène est notamment observé dans l'invagination des membranes lors d'événements d'endocytose. La présence de moteurs de kinésines, des protéines capables de se déplacer et liées au transport de composés dans la cellule, est souvent associée à la formation de tubes.

Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et peuvent survenir en même temps ou successivement. Le bourgeonnement fait en effet intervenir plusieurs types de mécanismes, certains qui génèrent de la courbure, permettant de déformer la membrane et d'autres qui détectent la courbure et permettent de stabiliser et/ou de propager la déformation.

3.1.3 Modélisation des membranes biologiques

Généralités

Plusieurs types de modèles sont utilisés pour explorer le comportement des membranes biologiques. Trois grands types de modèles existent qui utilisent des techniques différentes et sont valables à des échelles différentes.

Les modèles de dynamique moléculaire prennent en compte les interactions entre atomes pour expliquer le comportement de petits systèmes biologiques à l'échelle du nanomètre, voir par exemple [Pronk et al., 2013, Phillips et al., 2005]. Les temps de calcul peuvent être extrêmement longs pour des systèmes de grande taille.

Les modèles *coarse-grained* permettent de s'intéresser à des processus à l'échelle de des protéines [Marrink and Tieleman, 2013, Plimpton, 1995]. Dans ce type de modèle, on représente des groupes d'atomes par des entités (abstraites) élémentaires, définies à l'échelle d'intérêt, qui interagissent entre elles. Ce type de modèle nécessite la définition de potentiels d'interactions qu'il faut calibrer par l'expérimentation ou par des modèles de dynamique moléculaire. Ils s'appliquent généralement pour des systèmes à l'échelle d'une dizaine de nanomètres.

Enfin, les modèles continus s'appliquent à des échelles plus larges et permettent de représenter explicitement des membranes ou des vésicules régies par des équations faisant intervenir des termes de courbure, des termes électrostatiques, etc. Les calculs dans les modèles continus sont généralement faits à l'équilibre.

Dans la suite nous utiliserons ce type de modèle pour explorer la formation des corps lipidiques. Une discussion sur les hypothèses et la validité des résultats sera donnée dans la suite.

Modèles continus

La forme d'équilibre des membranes biologiques, supposées infiniment fines et inextensibles, peut être obtenue en minimisant une énergie libre prenant en compte la rigidité de la membrane et d'éventuelles contraintes imposées par le système considéré. L'énergie libre correspondante est attribuée à Helfrich [Helfrich, 1973] et Canham [Canham, 1970] et prend la forme générale suivante :

$$\mathcal{F} = \mathcal{E}_c + \sigma\mathcal{A} + p\mathcal{V} \tag{3.6}$$

Où $\mathcal{E}_c$ est l'énergie de courbure de la membrane, $\mathcal{A}$ son aire, σ un multiplicateur de Lagrange, homogène à une tension, correspondant à une contrainte sur la surface, $\mathcal{V}$ un volume et p le multiplicateur de Lagrange, homogène à une pression, correspondant à une contrainte sur le volume. L'énergie de courbure $\mathcal{E}_c$ est définie par :

$$\mathcal{E}_c = \int_{\mathcal{A}} \left[\frac{\kappa}{2}(H - C_0)^2 + \kappa_G H_G\right] dA \tag{3.7}$$

L'énergie de courbure fait intervenir le module de rigidité de la membrane κ et le module élastique gaussien κ_G. Le terme de courbure gaussienne, faisant intervenir κ_G, est généralement omis car c'est un invariant topologique et que l'on considère généralement des

membranes qui ne changent pas de topologie. Les deux termes H et H_G dépendent des courbures principales de la membrane :

$$H = C_1 + C_2 \tag{3.8}$$
$$H_G = C_1 C_2 \tag{3.9}$$

Le calcul effectif des formes associées à des modèles de membrane nécessite généralement de considérer la membrane comme une interface à deux dimensions infiniment fine, de la représenter à l'aide d'une fonction u et de faire des hypothèses générales sur la forme ou les déformations subies. Il devient alors possible d'exprimer aisément les aires, les volumes et les courbures de la membranes à l'aide de relations géométriques et de procéder aux calculs de la forme en précisant les conditions aux bords du système (symétrie, membrane fixée, membrane libre, etc).

Cas des petites déformations

La représentation de Monge consiste à représenter la membrane comme une fonction u définie dans un repère cartésien. En dimension un, en faisant, l'hypothèse que les déformations de la membrane restent petites, c'est à dire $\left|\frac{du}{dx}\right| \ll 1$, on peut approcher la courbure de u par :

$$H \approx \frac{d^2u}{dx^2}$$

Ainsi l'hamiltonien (3.6) pour une membrane plane s'écrit :

$$\mathcal{F} = \int_0^L \left[\frac{\kappa}{2} \left(\frac{d^2u}{dx^2} \right)^2 + \sigma \left(\frac{du}{dx} \right)^2 \right] dx$$

On peut alors minimiser cette énergie libre par des techniques classiques de calcul variationnel et obtenir la forme d'équilibre.

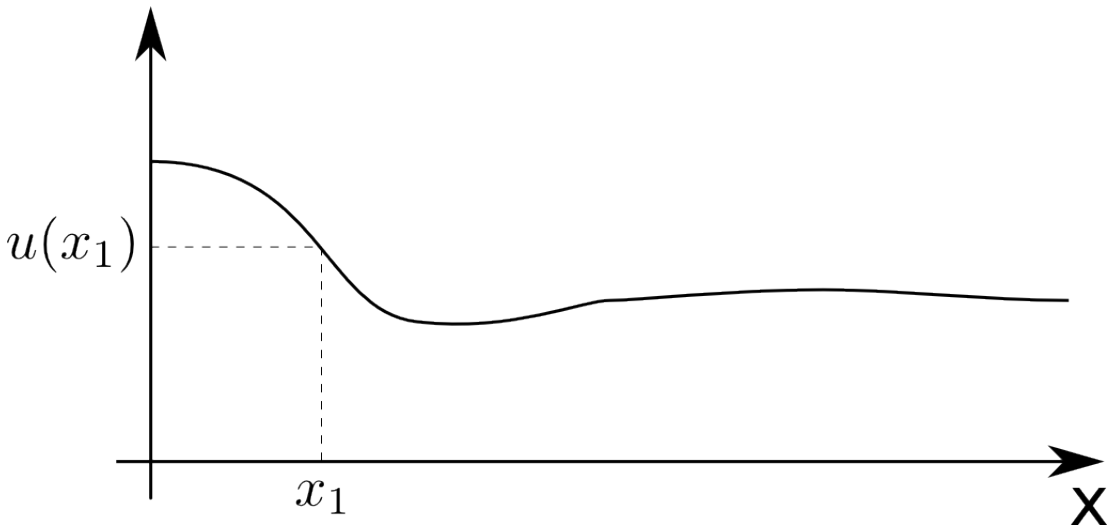


FIGURE 3.5 – Représentation de Monge d'une membrane à une dimension.

Cas des membranes axisymétriques

Pour traiter le cas des membranes présentant une symétrie axiale, on représente la membrane à partir de l'angle $\psi(s)$, et l'abscisse curviligne s. En notant r et z les coordonnées cartésiennes de la membrane, en obtient les relations suivantes :

$$\begin{cases} \dot{r} = cos\psi \\ \dot{z} = sin\psi \end{cases} \tag{3.10}$$

La figure 3.6 présente la paramétrisation d'une membrane avec une symétrie axiale.

On a alors les relations suivantes sur le volume V, l'aire A et les courbures de la membrane C_1 et C_2 entre les points s_0 et s_1 :

$$\begin{aligned} V &= -\int_{s_0}^{s_1} \pi r^2 sin\ \psi ds \\ dA &= 2\pi r ds \\ C_1 &= \dot{\psi} \\ C_2 &= \frac{sin\psi}{r} \end{aligned} \tag{3.11}$$

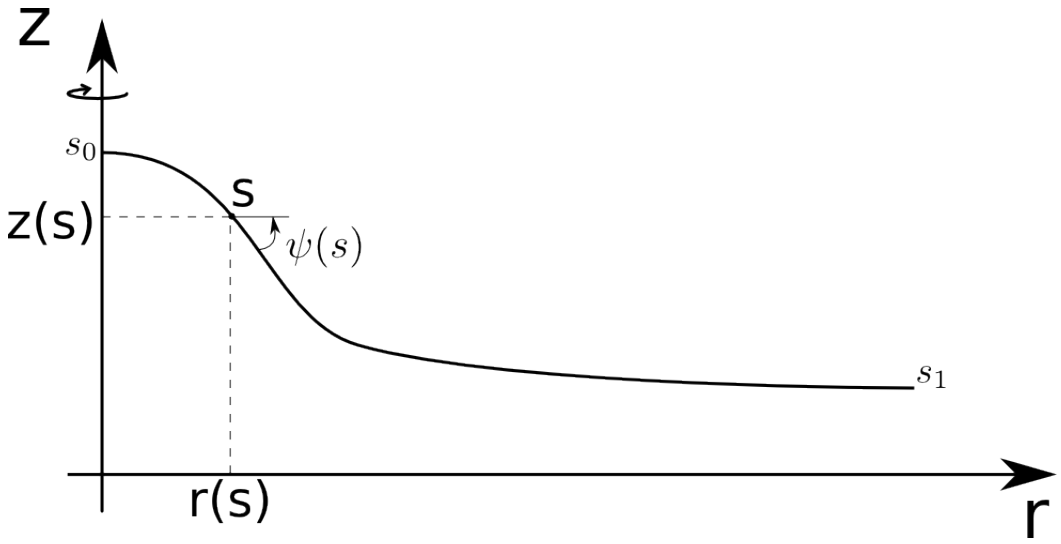


FIGURE 3.6 – Paramétrisation d'une membrane axisymétrique.

L'énergie libre (3.6) devient alors :

$$\mathcal{F} = 2\pi \int_{s_0}^{s_1} \left[\frac{\kappa}{2} \left(\dot{\psi} + \frac{sin\psi}{r} - C_0 \right)^2 r + \sigma 2r + \frac{p}{r^2} sin\psi \right] ds \tag{3.12}$$

On peut calculer la forme d'équilibre d'une telle membrane, en se donnant des conditions aux bords, par des techniques de calcul variationnel [Jülicher and Seifert, 1994].

3.2 Un modèle de formation des corps lipidiques

Dans cette section, on se propose de mettre en place et d'explorer un modèle de formation des corps lipidiques. Un rappel des concepts physiques liés à la formation des corps

lipidiques proposés dans [Thiam and Forêt, 2016] afin de situer précisément le modèle proposé est donné. Le modèle et les techniques de simulation sont ensuite présentés. Enfin, une dernière partie présente et discute les résultats de différentes versions du modèle.

3.2.1 Les phénomènes physiques de la formation des corps lipidiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la formation *de novo* des corps lipidiques a lieu, chez les eucaryotes, au niveau du réticulum endoplasmique et implique les voies métaboliques de synthèse des lipides neutres, des phospholipides et des protéines. Les corps lipidiques naissent dans la membrane du réticulum endoplasmique qui forme un réseau complexe de membranes relativement planes. Les corps lipidiques bourgeonnent ensuite vers le cytosol pour former des gouttes sphériques. Le processus de formation des corps lipidiques peut ainsi être séparé en trois étapes (voir figure 2.3) :

1. Nucléation : agrégation des lipides neutres en un site de nucléation,
2. Croissance : croissance de l'agrégat par ajout de lipides neutres,
3. Bourgeonnement : transition vers une forme sphérique.

Les principales caractéristiques du processus de formation des corps lipidiques sont notamment :

— Universalité : ce phénomène n'est pas spécifique à une espèce et n'implique pas de protéine spécifique.

— Le bourgeonnement est dirigé principalement vers le cytosol.

— Aucune machinerie spécifique de bourgeonnement n'a été mise en évidence.

Nucléation

Les lipides neutres sont produits par leurs enzymes de synthèse au niveau du réticulum endoplasmique et diffusent librement à l'intérieur de la membrane du reticulum. Les auteurs de [Thiam and Forêt, 2016] suggèrent que la formation de lentilles de lipides neutres s'explique par des mécanismes de séparation de phases analogues à ceux décrits à la section 3.1.1. Dans ce modèle, les lipides neutres s'agrègent pour minimiser les interactions avec des molécules différentes, en particulier les phospholipides et les protéines de la membrane du réticulum. Dans ce phénomène de nucléation, tout comme dans les phénomènes de séparation de phase évoqués précédemment, il existe une concentration critique au delà de laquelle les lipides neutres s'agrègent spontanément. La différence d'énergie libre entre une molécule dans un agrégat et une molécule libre dans la membrane du réticulum s'écrit [Thiam and Forêt, 2016] :

$$\Delta\mu = \varepsilon_{libre} - \varepsilon_{agrégat} + K_b T ln\phi \tag{3.13}$$

Où ε_{libre} est l'énergie d'interaction d'une molécule libre dans la membrane du réticulum, $\varepsilon_{agrégat}$ l'énergie d'interaction d'une molécule dans un agrégat et ϕ la concentration de molécules libres. En général, $\varepsilon_{libre} > \varepsilon_{agrégat}$ et $\Delta\mu$ est positif, ce qui rend possible l'agrégation spontanée, lorsque ϕ dépasse une concentration critique ϕ^*.

La nucléation est un processus stochastique et par conséquent, seule une partie des agrégats survit et grandit, tandis qu'une majorité se disperse. Cette barrière de nucléation est liée à l'existence d'un maximum dans l'énergie de l'agrégat pour un volume V^*. Ainsi,

les agrégats qui dépassent ce volume V^* peuvent grandir en accumulant des molécules. L'agitation thermique permet à certains agrégats de dépasser cette barrière d'énergie et de se développer.

La morphologie du réticulum endoplasmique est complexe et la probabilité de formation d'un agrégat, et par conséquent le taux de nucléation, dépendent fortement de la composition et de la topologie locale du réticulum endoplasmique. De plus, le taux de production des lipides neutres et leur vitesse de diffusion peuvent avoir une influence sur les sites de nucléation ainsi que le recrutement de phospholipides ou de protéines spécifiques.

Croissance

Une fois un agrégat formé à l'intérieur de la membrane du réticulum, la croissance peut se faire de deux manières. Lorsque le taux de production des lipides neutre est élevé, les agrégats grandissent par absorption des molécules libres à l'intérieur des membranes du réticulum. Lorsque le taux de production est faible, la croissance peut se faire par mûrissement. Le mûrissement est un phénomène lent de diffusion des lipides neutres à travers le réticulum endoplasmique des petits agrégats (soumise de fortes sur-pressions) vers les gros (soumis à des sur-pressions moins fortes). La croissance peut aussi se faire par coalescence des agrégats, c'est à dire par le mélange des contenus de deux agrégats.

Bourgeonnement

Le bourgeonnement correspond au processus de déformation de la membrane du réticulum qui conduit à la formation d'une goutte sphérique qui peut ou non rester connectée au réticulum endoplasmique.

Comme mentionné dans la section 3.1.2, les processus de bourgeonnement en biologie impliquent généralement des protéines. Dans le cas du bourgeonnement des corps lipidiques, les protéines impliquées pourraient être par exemple les caveolines, les oléosines ou des protéines de la famille FIT (fat storage-inducing transmembrane) [Choudhary et al., 2015, Pol et al., 2014, Thiam and Forêt, 2016]. Cependant, il est intéressant de noter que des corps lipidiques des plantes peuvent se former même lorsque les niveaux d'expression des oléosines sont réduits et parfois même en l'absence d'oléosines [Shimada et al., 2008], suggérant ainsi la possibilité que les protéines aient un simple rôle de régulation. De plus, le bourgeonnement des corps lipidiques semblent communs aux corps lipidiques de plusieurs espèces différentes et qui n'ont pas de protéines en commun.

Le bourgeonnement des corps lipidiques a lieu principalement vers le cytosol. Ce phénomène reste à ce jour mal compris. Cependant, la directionnalité est certainement en lien avec une asymétrie entre les deux feuillets de la membrane du réticulum au niveau des lentilles. Cette asymétrie peut être de plusieurs types : différences de composition, différence de rigidité, différence de tension, courbure imposée par des protéines.

La section suivante propose un modèle de bourgeonnement des corps lipidiques qui fait intervenir la rigidité, la tension et le volume d'un agrégat de lipides neutres à l'intérieur de la membrane du réticulum endoplasmique.

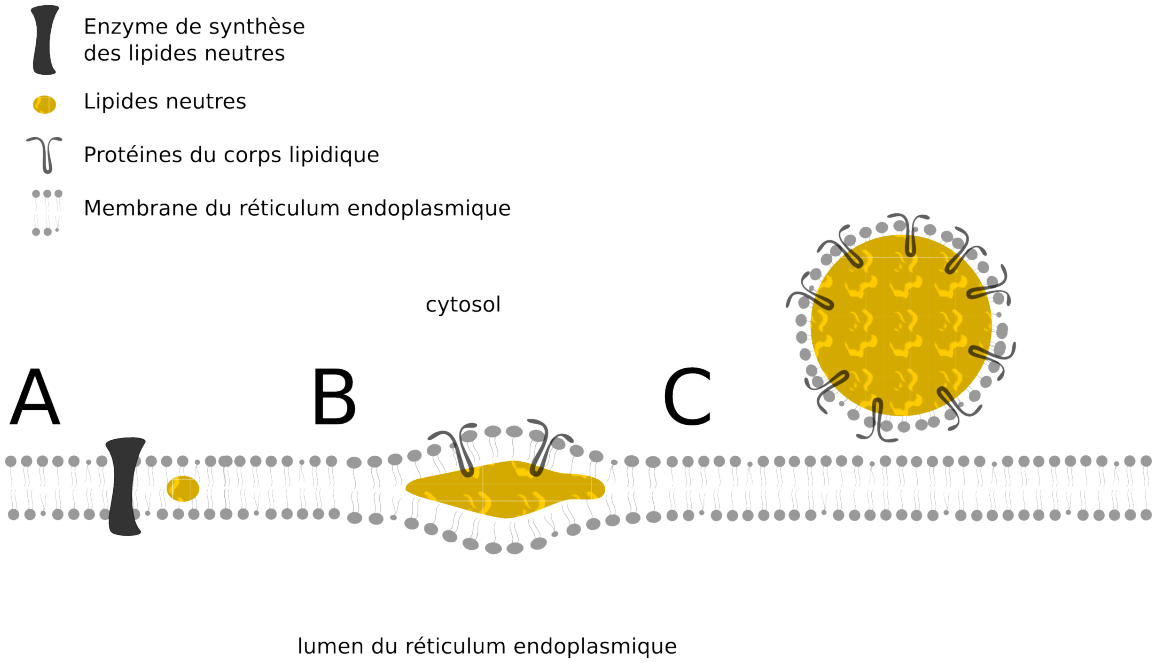


FIGURE 3.7 – Étapes de la formation *de novo* de corps lipidiques. A - Synthèse de lipides neutres, B - Accumulation de lipides neutres et de protéines, C - Migration du corps lipidique dans le cytosol.

3.2.2 Modèle de bourgeonnement et équation de la forme

On se propose de modéliser le bourgeonnement d'un corps lipidique formé à l'intérieur de la membrane du réticulum par un modèle continu de membranes élastiques fluides. La membrane du réticulum endoplasmique est une bicouche lipidique de rigidité κ_b qui sépare le lumen du réticulum du cytosol. La tension associée à cette membrane est notée σ_b. La présence d'un agrégat de volume V de lipides neutres entraîne l'ouverture de la bicouche (voir schéma 3.8) et on considère deux monocouches séparant respectivement les lipides neutres du cytosol et du lumen du réticulum. Ces deux monocouches peuvent avoir des compositions différentes et par conséquent on leur associe des rigidités κ_c et κ_l et des tensions σ_c et σ_l, respectivement pour les monocouches séparant les lipides neutres du cytosol et du lumen du réticulum. Chaque membrane possède aussi une courbure spontanée $C_{0c,l}$. Le lumen du réticulum endoplasmique et le cytosol ont des pressions internes P_c et P_l. Une tension de ligne τ s'applique au niveau du raccord des membranes. Son origine et son influence seront discutées à la section 3.3.4.

Énergie libre

L'énergie libre de ce système de trois membranes s'écrit alors :

$$\mathcal{F} = \sum_{i\,=\,c,l,b} \left[\mathcal{E}^i_{courbure} + \sigma_i A_i\right] - P_c V_c - P_l V_l + 2\pi R\tau \tag{3.14}$$

L'énergie libre comporte quatre contributions :

1. Une contribution liée à l'énergie de courbure des membranes $\mathcal{E}^i_{courbure}$, définie par (3.7).

Paramètre	Signification	Ordre de grandeur
$\sigma_{c,l}$	Tension de surface des monocouches c et l	$10^{-3}N.m^{-1}$
σ_b	Tension de surface de la bicouche b	$10^{-5}N.m^{-1}$
$\kappa_{c,l}$	Module de rigidité des monocouches c et l	$4 \cdot 10^{-20}J$
κ_b	Module de rigidité de la bicouche b	$\geq 2\kappa_c$
τ	Tension de ligne	$1pN$
$C_{0c,l,b}$	Courbures spontanées des membranes c, l et b	
$P_{c,l}$	Pressions du cytosol et du lumen	
P_0	Multiplicateur de Lagrange imposant la contrainte de volume	
$p_{c,lb}$	Multiplicateurs de Lagrange des pressions définies à partir de P_0 (3.20)	
V	Volume de la goutte	
$V_{c,l}$	Volumes déplacés dans les parties cytosol et lumen	
$A_{c,l,b}$	Surface des membranes c, l et b	
R	Distance du centre de la goutte aux bords	

TABLE 3.1 – Tableau récapitulatif des paramètres et notations du modèle. Les ordres de grandeurs sont extraits de [Deslandes et al., 2016].

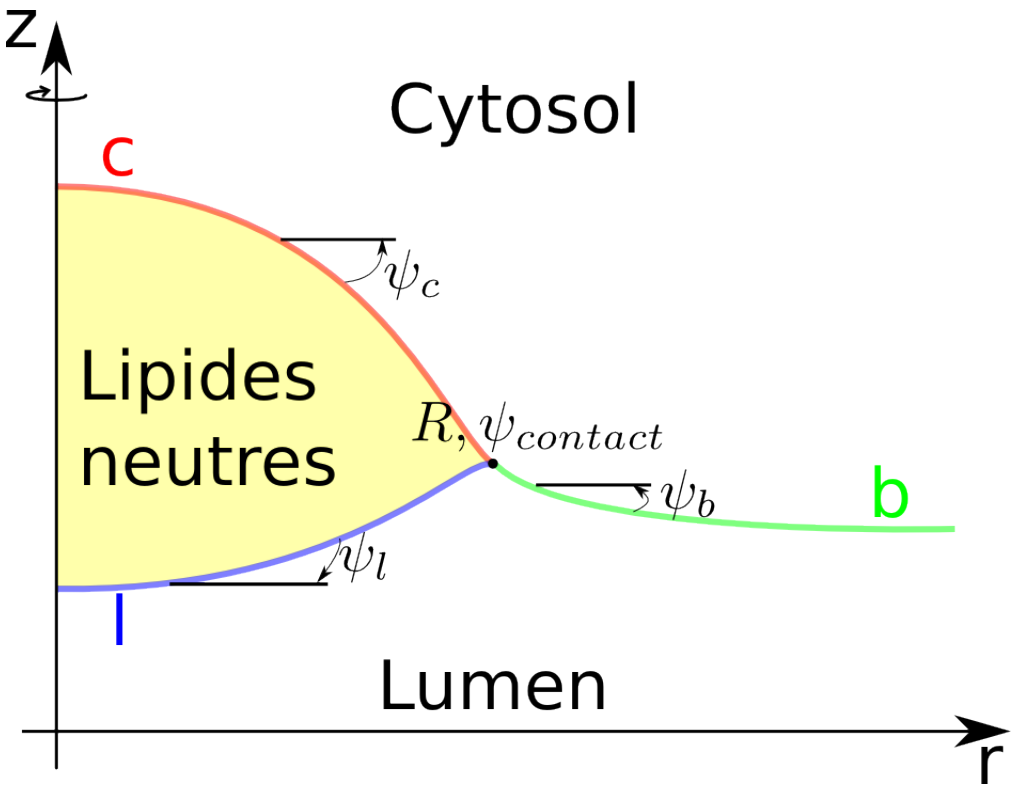


FIGURE 3.8 – Schéma de la paramétrisation des trois membranes impliquées dans le bourgeonnement des corps lipidiques.

2. Une contribution liée aux énergies interfaciales,
3. Une contribution liée au travail des forces de pression,
4. Une contribution liée à la tension de ligne.

Cette énergie libre correspond à la différence d'énergie entre un système avec les trois membranes et un système avec une simple bicouche plane. Les volumes V_c et V_l correspondent aux variations de volumes dans les parties cytosol et lumen associées à l'apparition d'une goutte de lipides neutres.

On suppose que la goutte a une symétrie axiale et on va utiliser la paramétrisation donnée par l'équation (3.10). Les membranes sont paramétrées par les angles ψ_c, ψ_l et ψ_b, définis comme indiqué sur la figure 3.8. Les deux monocouches sont définies de façon symétrique, de sorte que lorsque la forme de la goutte est symétrique par rapport à l'axe horizontal, on a $\psi_c(s) = \psi_l(s)$. Les extrémités des membranes sont notées s_{c0}, s_{l0} sur l'axe de symétrie, s_{c1}, s_{l1}, s_{b0} au niveau du point de contact.

La membrane est plane sur l'axe de symétrie sinon il y aurait une singularité de courbure, ainsi :

$$sin\ \psi_c(s_{c0}) = sin\ \psi_l(s_{l0}) = 0 \tag{3.15}$$

Au niveau du point de raccord des trois membranes, situé à une distance R de l'axe de symétrie, la continuité des membranes impose un même angle de contact $\psi_{contact}$. On a donc les relations suivantes :

$$r_c(s_{c1}) = r_l(s_{l1}) = r_b(s_{b0}) = R \tag{3.16}$$

$$\psi_c(s_{c1}) = -\psi_l(s_{l1}) = \psi_b(s_{b0}) = \psi_{contact} \tag{3.17}$$

Afin de déterminer la forme d'équilibre, on va procéder à la minimisation de l'énergie libre à volume fixé. On définit donc un multiplicateur de Lagrange, P_0, qui peut s'interpréter comme la pression interne à la goutte, permettant de minimiser l'énergie en imposant la contrainte de volume.
La paramétrisation retenue impose la contrainte géométrique (3.10). On introduit donc d'autres multiplicateurs de Lagrange $\gamma_i(s_i)$ pour chacune des membranes. En utilisant les relations (3.11), on est amené à minimiser l'énergie libre augmentée suivante :

$$\mathcal{G} = \sum_{i\,=\,c,l,b} \int_{s_{i0}}^{s_{i1}} \left[\frac{\kappa_i}{2} \left(\dot{\psi}_i + \frac{sin\psi_i}{r_i} - C_{0i} \right)^2 2\pi r_i + \sigma_i 2\pi r_i + \frac{p_i}{2} r_i^2 sin\psi_i + 2\pi\gamma_i(\dot{r}_i - cos\psi_i) \right] ds + 2\pi R\tau \tag{3.18}$$

Que l'on peut écrire :

$$\mathcal{G} = \sum_{i\,=\,c,l,b} \int_{s_{i0}}^{s_{i1}} \mathcal{L}_i ds + 2\pi R\tau$$

Où le Lagrangien $\mathcal{L}_i$ est défini par :

$$\mathcal{L}_i = \frac{\kappa_i}{2} \left(\dot{\psi}_i + \frac{sin\psi_i}{r_i} - C_{0i} \right)^2 2\pi r_i + \sigma_i 2\pi r_i + \frac{p_i}{2} r_i^2 sin\psi_i + \gamma_i \dot{r}_i - \gamma_i cos\psi_i \tag{3.19}$$

Les pressions p_i sont définies à partir des pressions du cytosol P_c, du lumen P_l et du multiplicateur de Lagrange P_0. Elles peuvent être interprétées comme les différences de pressions entre chaque interface. On les définit de la façon suivante :

$$\begin{aligned} p_c &= P_0 - P_c \\ p_l &= P_0 - P_l \\ p_b &= P_l - P_c \end{aligned} \tag{3.20}$$

Le problème considéré impose de laisser libres les variations au niveau du point de contact. Le couplage des trois membranes entraîne les variations suivantes :

$$\delta r_c(s_{c1}) = \delta r_l(s_{l1}) = \delta r_b(s_{b0}) = \delta R \tag{3.21}$$

$$\delta\psi_c(s_{c1}) = \delta\psi_l(s_{l1}) = \delta\psi_b(s_{b0}) = \delta\psi_{contact} \tag{3.22}$$

La symétrie axiale impose pour les membranes c et l des variations nulles au niveau de l'axe de symétrie :

$$\delta r_c(s_{c0}) = \delta r_l(s_{l0}) = 0 \tag{3.23}$$

$$\delta\psi_c(s_{c0}) = \delta\psi_l(s_{l0}) = 0 \tag{3.24}$$

On suppose que la membrane b se comporte comme si elle était fixée à un point infiniment loin de l'axe de symétrie. Les autres variations sont libres, en particulier, la surface des membranes n'est pas fixée.

La variation de l'énergie libre augmentée $\mathcal{G}$ s'écrit alors :

$$\delta\mathcal{G} = \sum_{i\,=\,c,l,b} \int_{s_{i0}}^{s_{i1}} \left[\left(\frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial r} - \frac{d}{ds}\frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial\dot{r}} \right) \delta r_i + \left(\frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial\psi} - \frac{d}{ds}\frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial\dot{\psi}} \right) \delta\psi_i \right] ds \tag{3.25}$$

$$\sum_{i\,=\,c,l,b} \left[\frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial\dot{\psi}}\delta\psi_i + \frac{\partial\mathcal{L}_i}{\partial\dot{r}}\delta r_i - \mathcal{H}_i\delta s_i \right]\Bigg|_{s_{i1}}^{s_{i0}} + \tau\delta R \tag{3.26}$$

Le terme $\mathcal{H}_i$ provient du fait que le lagrangien $\mathcal{L}_i$ ne dépend pas explicitement de s_i. Le long de la membrane, ce terme reste constant :

$$\begin{aligned}\mathcal{H}_i &= \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{\psi}}\dot{\psi} + \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{r}}\dot{r} - \mathcal{L}_i \\ &= \frac{\kappa_i r_i}{2}u_i^2 - \frac{\kappa_i r_i}{2}\left(\frac{sin\psi_i}{r_i} - C_{0i}\right)^2 + p_i r_i \frac{sin\psi_i}{2} - \gamma_i r_i + \gamma_i cos\psi_i \\ &= \text{Constante}\end{aligned} \tag{3.27}$$

Pour annuler cette variation $\delta\mathcal{G}$, il nous faut annuler conjointement le terme intégral (3.25) et le terme de bord (3.26).

Terme intégral

Conformément au théorème des variations, le terme intégral (3.25) s'annule lorsque le système d'équations suivant est vérifié pour chacune des membranes :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r} - \dfrac{d}{ds}\dfrac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{r}} = 0 \\ \dfrac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi} - \dfrac{d}{ds}\dfrac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{\psi}} = 0 \end{cases}$$

Ces équations conduisent à un résultat bien connu, [Jülicher and Seifert, 1994] :

$$\begin{cases} \dot{r}_i = cos\psi_i \\ \dot{\psi}_i = u_i \\ \dot{\gamma}_i = \dfrac{\kappa_i}{2}(u_i - C_{0i})^2 - \dfrac{\kappa_i}{2}\left(\dfrac{sin\psi}{r_i}\right)^2 + \sigma_i - p_i r_i sin\psi_i \\ \dot{u}_i = -u_i\dfrac{cos\psi_i}{r_i} + \dfrac{cos\psi_i sin\psi_i}{r^2} + \gamma_i\dfrac{sin\psi_i}{\kappa_i r_i} - \dfrac{p_i}{2\kappa_i}r_i cos\psi_i \end{cases} \tag{3.28}$$

Terme de bord

Le terme de bord fait intervenir la spécificité du système considéré, en particulier le couplage des trois membranes.

Pour annuler le terme de bord, on doit annuler conjointement tous les termes, ce qui implique les expressions suivantes :

$$\sum_{i\,=\,c,l,b} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{r}} + \tau = 0 \tag{3.29}$$

$$\sum_{i\,=\,c,l,b} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \dot{\psi}} = 0 \tag{3.30}$$

$$\mathcal{H}_i = 0 \tag{3.31}$$

Sur l'axe de symétrie, pour satisfaire aux contraintes de symétrie, on doit vérifier la condition (3.15). En utilisant le fait que $\mathcal{H}_i$ est une constante et est nécessairement nul en raison de la condition (3.31), on trouve des expression pour $\gamma_c(s_{c0})$ et $\gamma_l(s_{l0})$.

Au point de raccord, on doit satisfaire les conditions de couplage des membranes, qui impliquent les relations (3.29), (3.30). Ainsi, pour annuler les variations, on doit avoir :

$$\gamma_c(s_{c1}) + \gamma_l(s_{l1}) - \gamma_b(s_{b0}) + \tau = 0 \tag{3.32}$$

$$\kappa_b r_b \left(\dot{\psi}_b + \frac{sin\psi_b}{r_b} - C_{0b} \right) - \sum_{i=c,l} \kappa_i r_i \left(\dot{\psi}_i + \frac{sin\psi_i}{r_i} - C_{0i} \right) = 0 \tag{3.33}$$

La condition à l'infini (*i.e.* au point s_{b1}) pour la membrane b donne :

$$\kappa_b r_b \left(\dot{\psi}_b + \frac{sin\psi_b}{r_b} - C_{0b} \right) = 0 \tag{3.34}$$

Si on suppose (comme ça sera le cas dans la suite) que la différence de pression entre le lumen et le cytosol est nulle et que $C_{0b} = 0$, on a la condition suivante :

$$\psi_b(s_{b1}) = u_b(s_{b1}) = 0 \tag{3.35}$$

Problème d'optimisation

Finalement, il nous faut résoudre le problème suivant :

$$\begin{cases} \text{Trouver } r_{c,l,b}, \psi_{c,l,b}, \gamma_{c,l,b}, u_{c,l,b} \text{ qui vérifient :} \\ \quad \text{— le système d'équation (3.28)} \\ \quad \text{— les conditions (3.15), (3.34), (3.35), (3.32), (3.31)} \end{cases} \tag{3.36}$$

C'est un problème aux limites avec couplage des trois membranes dont la solution n'est pas unique. Les équations sont non-linéaires et il n'est pas possible de trouver de solutions analytiques. On va donc mettre en place une méthode numérique de résolution. La méthode numérique est présentée dans les grandes lignes dans la section suivante. Plusieurs méthodes seront explicitées dans la description des résultats obtenus pour plusieurs versions issues de ce modèle. La résolution de ce problème permet de déterminer les extrema locaux de $\mathcal{G}$, il nous faudra par la suite déterminer la nature de ces extrema (minimum local ou point selle).

3.2.3 Résolution numérique

Trouver la forme de la goutte revient à résoudre trois problèmes aux limites formés chacun d'un système de quatre équations différentielles non linéaires. Parmi les 24 conditions aux bords, six sont imposées par la symétrie du problème et trois se déduisent du problème considéré. Les équations sont couplées entre elles par plusieurs conditions aux bords. Les conditions restantes sont libres et doivent être déterminées en fonction des paramètres du modèle.

On va utiliser une méthode de tir pour résoudre le problème aux limites. On sera amené à intégrer numériquement les équations différentielles. Cette section présente les différentes méthodes utilisées pour calculer numériquement les formes d'équilibres.

Méthode de tir

La résolution du problème aux limites par la méthode de tir consiste à résoudre un problème d'optimisation. On choisit une fonctionnelle adaptée au problème que l'on optimise par rapport aux conditions initiales. La résolution du problème d'optimisation nécessite d'intégrer numériquement le système d'équation différentielle pour une condition initiale donnée. L'intégration numérique est effectuée avec un critère d'arrêt imposé par le problème.

Cette technique est mise en œuvre sur plusieurs problèmes dérivés du modèle présenté dans cette section. Des précisions supplémentaires sur les critères d'arrêt et les fonctionnelles seront données dans les sections suivantes.

Pour trouver la solution du problème considéré, on est amené à résoudre un problème d'optimisation. Si on appelle $z_{c,l,b}(s_{c,l,b}; x^0_{c,l,b})$ la solution du système 3.28 pour une condition initiale $x^0_{c,l,b}$ à un bord donné. la solution du problème 3.36 peut alors s'écrire :

$$\begin{cases} z_{c,l,b}(s_{c,l,b}; x^{0*}_{c,l,b}) \\ Avec \\ x^{0*}_{c,l,b} = \underset{x^0_{x,l,b}}{\arg\min} \left| \mathcal{U}\left(z_{c,l,b}(s_{c,l,b}; x^0_{c,l,b})\right) \right| \end{cases} \tag{3.37}$$

Où $\mathcal{U}$ est une fonctionnelle qui dépend du problème considéré. On remplacera la solution $z_{c,l,b}(s_{c,l,b}; x^0_{c,l,b})$ par une solution numérique approchée, obtenue par une méthode d'intégration F telle que :

$$\tilde{z}_{c,l,b}(s^{k+1}_{c,l,b}; x^0_{c,l,b}) = F\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s^k_{c,l,b}; x^0_{c,l,b})\right) \tag{3.38}$$

On poursuit la résolution numérique du système jusqu'à la condition :

$$\left|\mathcal{M}\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s^k_{c,l,b}; x^0_{c,l,b})\right)\right| < \varepsilon \tag{3.39}$$

Où ε est un paramètre de tolérance fixé et $\mathcal{M}$ une fonctionnelle à définir en fonction du problème. On utilise typiquement les conditions aux bords opposées pour définir un critère d'arrêt.

Enfin, il est nécessaire de disposer d'une fonctionnelle $\mathcal{G}$ pour mettre à jour la condition initiale dans l'algorithme d'optimisation :

$$x^{0,i+1}_{c,l,b} = \mathcal{G}(x^{0,i}_{c,l,b}) \tag{3.40}$$

L'algorithme consiste à résoudre le système d'équations pour une condition initiale et à mettre à jour la condition initiale afin d'optimiser le critère $\mathcal{U}$. Les étapes de l'algorithme sont données dans l'algorithme 1.

L'application de cette méthode au problème considéré est directe mais nécessite de définir les critères $\mathcal{M}$, $\mathcal{U}$ et $\mathcal{G}$ en tenant compte du couplage des trois membranes. Un exemple est donné dans la suite. Cette méthode est particulièrement adaptée car elle ne nécessite pas de mettre en place un maillage (problème difficile car la surface des membranes n'est pas fixée à l'avance) et qu'elle peut être mise en place facilement (coûts et temps de calcul relativement faibles de l'intégration numérique).

Algorithme 1 Algorithme de la méthode de tir

Entrée : $x_{c,l,b}^{0,0}$: condition initiale
Entrée : ε : précision
i=0
k=0
Tant que $\left|\mathcal{M}\left(z_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k})\right)\right| > \varepsilon$ **Faire**
$\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k+1}; x_{c,l,b}^{0,0}) = F\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k}; x_{c,l,b}^{0,0})\right)$
$k = k + 1$
FinTantQue
Tant que $\left|\mathcal{U}\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k}\right)\right| > \varepsilon$ **Faire**
$x_{c,l,b}^{0,i+1} = \mathcal{G}(x_{c,l,b}^{0,i})$
$k = 0$
$i = i + 1$
Tant que $\left|\mathcal{M}\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k}\right)\right| > \varepsilon$ **Faire**
$\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k+1}; x_{c,l,b}^{0,i}) = F\left(\tilde{z}_{c,l,b}(s_{c,l,b}^{k}; x_{c,l,b}^{0,i})\right)$
$k = k + 1$
FinTantQue
FinTantQue

Méthodes numériques

L'intégration numérique des équations (3.28) peut être effectuée par des techniques classiques d'analyse numérique comme la méthode de Runge-Kutta détaillée ici. Pour plus de détails sur les méthodes d'intégration numérique, on peut se référer à [Demailly, 2017].

La méthode de Runge-Kutta permet de résoudre le problème de Cauchy :

$$\begin{cases} y' = F(y,t) \quad t \in [t_0, t_0 + T] \\ y(t_0) = y_0 \end{cases} \tag{3.41}$$

Où F est une fonction continue. La méthode repose sur la discrétisation de l'intervalle $[t_0, t_0 + T]$ en $t_0 < t_1 < \cdots < t_n = t_0 + T$ et le calcul des valeurs y_n à partir de points intermédiaires $(t_{n,i}, y_{n,i})$. L'algorithme récursif de calcul est basé sur des méthodes d'intégration numérique et défini de la façon suivante :

$$\begin{cases} t_{n,i} = t_n + c_i h_n \\ y_{n,i} = y_n + h_n \sum\limits_{1 \le j \le i} a_{ij} p_{n,j} \\ p_{n,i} = F(t_{n,i}, y_{n,i}) \\ t_{n+1} = t_n + h_n \\ y_{n+1} = y_n + h_n \sum\limits_{1 \le j \le q} b_j p_{n,j} \end{cases} \tag{3.42}$$

Les paramètres a_{ij} et b_j sont choisis en fonction des méthodes d'intégration numérique,

et h_n est le pas de discrétisation. On a les relations suivantes :

$$c_i = \sum_{1 \leq j \leq i} a_{ij} \qquad \sum_{1 \leq j \leq q} b_j = 1$$
$$c_1 = 0 \quad t_{n,1} = t_n \quad y_{n,1} = y_n$$

Les méthodes de Runge-Kutta sont numériquement stables et consistante. L'ordre de la méthode dépend de l'ordre des méthodes d'intégration retenue. Il est possible d'adapter le choix de pas h_n afin de contrôler l'erreur commise. L'adaptation du pas permet aussi de s'adapter à la régularité de la solution. Pour cela, il est nécessaire de fixer une valeur de tolérance globale δ et de choisir les pas de sorte que $\max \frac{|e_n|}{h_n} < \delta$, où e_n représente l'erreur de consistance, c'est à dire l'écart entre la solution et la solution approchée.

La recherche de minimum, dans le cadre de la méthode de tir, peut être effectuée par une méthode de bissection ou par un algorithme du polytope. Ce genre d'algorithme est adapté au cas considéré car on ne dispose pas des gradients de la fonctionnelle $\mathcal{U}$. On ne connaît pas non plus les variations de $\mathcal{U}$ et on suppose simplement que cette fonctionnelle est continue.

La méthode de bissection consiste, à partir d'un intervalle $[a, b]$, dans lequel la fonction $\mathcal{U}$ possède un zéro unique, à réduire itérativement l'intervalle par comparaison des valeurs de $\mathcal{U}$. Cette algorithme nécessite $\mathcal{U}(a)\mathcal{U}(b) < 0$. On calcule la valeur de $\mathcal{U}$ dans un point c intérieur à $[a, b]$ et on réitère le procédé sur l'intervalle qui contient le zéro, $[c, b]$ si $\mathcal{U}(c)\mathcal{U}(b) < 0$, $[a, c]$ sinon. On s'arrête lorsque l'intervalle devient plus petit que la précision retenue. Si on sait calculer $\mathcal{U}$ avec une précision suffisante (en particulier le signe de $\mathcal{U}$), on a la garantie de trouver le zéro avec la bonne précision. Avec une tolérance δ, on trouve la solution avec approximativement $log(\frac{b-a}{\delta})$ évaluation de $\mathcal{U}$.

La méthode du polytope (aussi appelé simplexe), est une méthode de recherche directe de minimum, basée sur la connaissance de $\mathcal{U}$ en un certain nombre de points x_i. A chaque itération, on calcule la valeur de $\mathcal{U}$ en un nouveau point sur la ligne formé par le centroïde du polytope et le point où $\mathcal{U}$ a la plus grande valeur. On évalue ensuite la fonction à ce point. En fonction de la valeur de $\mathcal{U}$ en ce point, on remplace un des points du polytope, on étend le polytope ou le contracte.

Aspects techniques de la résolution numérique

Le problème impose de travailler à volume V fixé. Cependant, il est plus facile numériquement de travailler à pression fixée, c'est à dire avec p fixé, le volume de la goutte correspondant à une telle pression est donné par la résolution du problème aux limites (3.36). Les résultats pour un volume V donné se déduisent aisément en ajustant la valeur de p afin d'obtenir le volume V souhaité.

Pour la résolution numérique, on utilise les quantités adimensionnées suivantes :

$$\begin{aligned} &\lambda = \sqrt{\frac{\kappa_b}{\sigma_c}} \quad \widetilde{\sigma_b} = \frac{\sigma_b}{\sigma_c} \quad \Delta\sigma = \frac{\sigma_c - \sigma_l}{\sigma_c} \\ &\widetilde{\kappa_b} = \frac{\kappa_b}{\kappa_c} \quad \widetilde{p} = \frac{p\lambda^3}{\kappa_c} \quad \widetilde{V} = \frac{V}{\lambda^3} \end{aligned} \tag{3.43}$$

Rappelons que l'on s'intéresse aux phénomènes de bourgeonnement des corps lipidiques, c'est à dire au passage d'une forme allongée à une forme sphérique. On s'intéressera donc naturellement à l'évolution de la ou des formes adoptées par les membranes en fonction des paramètres du modèle, plus précisément le ratio des tensions σ_b/σ_c, la différence de tension entre les monocouches $\Delta\sigma = \frac{\sigma_c - \sigma_l}{\sigma_c}$, le ratio des rigidités des membranes κ_b/κ_c et la tension de ligne τ.

Plusieurs formes peuvent exister pour un volume donné et on s'intéresse à la stabilité des différentes solutions. Plusieurs situations sont possibles [Seifert et al., 1991a] :

— Forme stable : la forme correspond à un minimum global de l'énergie (pas nécessairement unique),

— Forme instable : la forme correspond à un point selle de l'énergie. Cette forme ne peut pas être observée en pratique. Les énergies associées aux formes instables donnent l'énergie d'activation nécessaire pour passer d'un minimum local à un autre.

— Forme métastable : la forme correspond à un minimum local de l'énergie. Elle peut être observée en pratique. La transition d'une forme métastable à une autre nécessite de franchir une barrière d'énergie. Si cette barrière est petite devant l'énergie thermique, la transition peut être spontanée.

La stabilité d'une solution peut évoluer avec un paramètre. Ces transitions s'appellent des bifurcations. Les diagrammes de bifurcations présentent des caractéristiques génériques qui aident à déduire la stabilité des différentes solutions [Seifert et al., 1991b]. Plusieurs situations sont possibles :

— Passage d'une forme stable à une forme instable.

— Passage d'une forme métastable à une forme stable (ou l'inverse).

L'étude de la stabilité des solutions est difficile dans le cas général. Dans la suite, on comparera les profils d'énergie pour les différentes solutions en fonction du volume afin de déterminer la nature des solutions.

Dans notre cas d'étude, on s'intéresse particulièrement aux domaines de stabilité et d'existence de formes allongées et de la forme sphérique ainsi qu'à la directionnalité du bourgeonnement.

3.3 Résultats

Dans cette section, plusieurs variations du modèle précédent sont présentées dans le but de décomposer l'effet de chaque paramètre sur le bourgeonnement. Dans un premier temps, on s'intéresse à l'effet d'une différence de tension entre les monocouches et la bicouche, cette dernière sera supposée infiniment rigide. Ce modèle présente une phénoménologie riche et son exploration permet de comprendre les méthodes de recherche des formes et les phénomènes de bourgeonnement présentés dans le cas du modèle complet. L'analyse de la stabilité des formes dans le modèle complet permet de mettre en évidence un phénomène spontané de bourgeonnement et de comprendre l'effet de la rigidité de la bicouche. On s'intéresse ensuite à l'effet d'une asymétrie de tension entre les deux monocouches qui induit une directionnalité dans le bourgeonnement. Enfin, une discussion sur le rôle de chaque paramètre est donnée.

3.3.1 Modèle avec monocouches identiques et bicouche infiniment rigide

Dans un premier modèle on suppose les deux monocouches complètement identiques, c'est à dire :

$$\sigma_c = \sigma_l \text{ et } \kappa_c = \kappa_l \tag{3.44}$$

On suppose aussi que la bicouche est complètement rigide :

$$\kappa_b = +\infty \tag{3.45}$$

La bicouche sera donc nécessairement plate et on peut simplement s'attacher à calculer la forme de deux monocouches.

Deux méthodes de calcul des formes sont alors possibles :

— Axe → Bord : Dans cette méthode, on résout le système (3.28) en partant de l'axe de symétrie vers le bord de la goutte. Les conditions initiales $u_{c,l}(s_{c0,l0})$ sur l'axe de symétrie sont inconnues. Les valeurs $\psi_{c,l}(s_{c0,l0})$ sont données par (3.15) et la valeur de $\gamma_{c,l}(s_{c0,l0})$ par (3.27). Le critère d'arrêt $\mathcal{M}$ est donné par la condition de raccord à la bicouche plate :

$$sin\ \psi_{c,l}(s_{c1,l1}) = 0 \tag{3.46}$$

On veut bien évidemment avoir des membranes qui se raccordent à la bicouche au même point. La fonctionnelle $\mathcal{U}$ est donc basée sur la condition :

$$r_c(s_{c1}) - r_l(s_{l1}) = 0 \tag{3.47}$$

L'équation (3.32) permet de ne pas fixer σ_b à l'avance. La recherche s'effectue dans l'intervalle $[0; u_{max}]$. La valeur maximale correspond à la valeur pour laquelle la solution devient une sphère (de rayon R) et est donnée par $u_{max} = 1/R$. La valeur minimale correspond à une membrane plate.

— Bord → Axe : Dans cette méthode, on va résoudre en partant du bord vers l'axe. Les conditions initiales sont données par la condition de raccord avec la bicouche plate $\psi_{c,l}(s_{c1,s1}) = 0$, $u_{c,l}(s_{c1,s1}) = 0$. Les $\gamma_{c,l}$ sont obtenus pour des valeurs de $R = r_c(s_{c1}) = r_l(s_{l1})$ à partir de (3.27). La condition d'arrêt $\mathcal{M}$ est donnée par la symétrie axiale :

$$sin\psi_{c,l}(s_{c0,l0}) = 0 \tag{3.48}$$

Et on optimise sur R une fonctionnelle $\mathcal{U}$ basée sur la condition :

$$r_c(s_{c0}) = r_l(s_{l0}) = 0 \tag{3.49}$$

Cette méthode est plus adaptée aux cas où la pression p est faible ($p < 0.2$).

Dans le cas où les deux monocouches ont des propriétés identiques, deux conditions initiales restent libres. De plus, la valeur de σ_b/σ_c peut être obtenue à posteriori pour deux conditions initiales données. Ainsi, il est possible d'explorer les valeurs de la fonctionnelle $\mathcal{U}$ pour des valeurs de conditions initiales données.
La figure 3.9, présente les valeurs de la fonctionnelle pour différentes valeurs de $u_c(s_{c0})$ et $u_l(s_{l0})$. Les solutions acceptables sont évidement les points pour lesquels la fonctionnelle s'annule. On constate qu'il existe alors trois types de solutions. Les solutions pour lesquelles $u_c(s_{c0}) = u_l(s_{l0})$, qui conduisent à des formes parfaitement symétriques. Les

solutions pour lesquelles $u_c(s_{c0}) = 0$ (ou $u_l(s_{l0}) = 0$), qui correspondent à des solutions où l'une des deux membranes est complètement plate. Et enfin, les solutions pour lesquelles $u_c(s_{c0}) \neq u_l(s_{l0})$ et $u_c(s_{c0}) \neq 0$ et $u_l(s_{l0}) \neq 0$, qui conduisent à des formes asymétriques. Les deux membranes étant complètement identiques, à chaque forme asymétrique correspond sa forme miroir (par rapport à l'axe horizontal qui passe par le point de raccord des deux membranes). Bien évidement, la sphère est aussi solution. La figure 3.10 présente le type de formes observées.

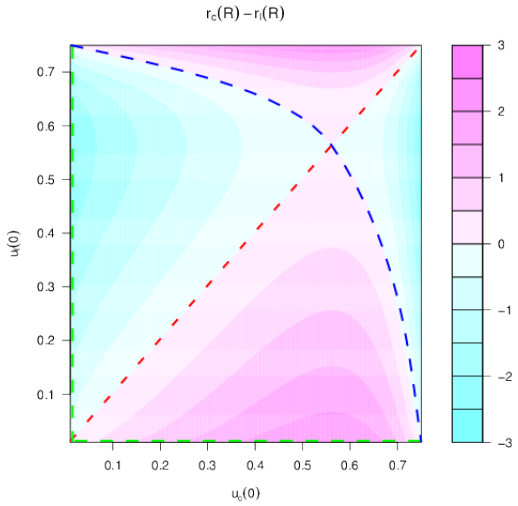


FIGURE 3.9 – Valeurs de la fonctionnelle $\mathcal{U}$ basée sur (3.47) en fonction de $u_c s_{c0}$ et $u_l s_{l0}$. Les lignes rouge, vertes et bleue correspondent aux zéros de la fonctionnelle. Elles correspondent aux solutions symétriques (rouge), asymétriques (bleue) et avec une membrane plate (vertes).

On constate sur la figure 3.9, que les solutions forment trois lignes. Le long de chacune de ces lignes, on trouve la valeur de σ_b/σ_c correspondant à la forme obtenue pour ces valeurs de conditions initiales. La figure 3.11, présente les valeurs de σ_b/σ_c le long de ces trois lignes de solutions. Certaines valeurs de σ_b/σ_c sont négatives et les formes correspondantes ne sont donc pas observables. On constate aussi que pour une valeur de σ_b/σ_c donnée, plusieurs formes peuvent être solutions.

Naturellement, chacune de ces formes a une énergie différente. La figure 3.12 présente l'évolution de l'énergie de chacune des formes de la figure 3.10 en fonction du volume. On constate notamment que les formes 2 et 3 sont très énergétiques, avec des énergies presque deux fois supérieures à celle de la sphère. Ces formes très énergétiques, sont instables et ne peuvent pas être observées en pratique.
On remarque aussi que certaines formes ont des énergies très proches de celle la sphère, le coût énergétique du raccord à la bicouche étant extrêmement faible. En pratique, il est impossible de les différencier de la sphère.
Il est intéressant de noter que la forme symétrique 1 est toujours la moins énergétique des formes non sphériques. Cependant, pour certains volumes, cette forme devient métastable. Comme on peut le voir sur la figure 3.13, qui présente le ratio de l'énergie libre de la forme 1 et de la sphère (à pression fixée), il existe des valeurs de σ_b/σ_c pour lesquelles la sphère a une énergie plus faible pour certaines pressions (donc certains volumes). Une étude de

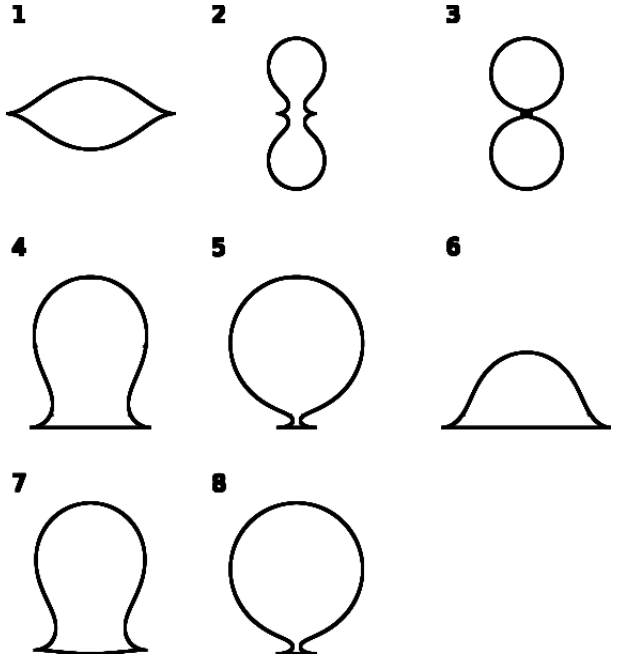


FIGURE 3.10 – Typologie des formes dans le modèle ou les deux monocouches ont les mêmes propriétés.

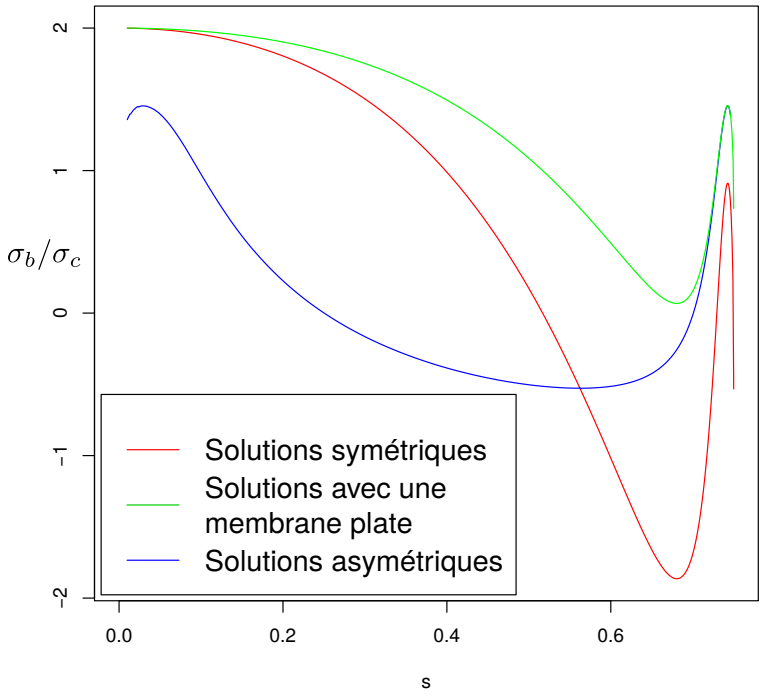


FIGURE 3.11 – Valeurs de σ_b le long des zéros de la fonctionelle $\mathcal{U}$.

la stabilité des formes est donnée dans la section suivante dans laquelle on considère un modèle sans l'hypothèse sur la rigidité de la bicouche.

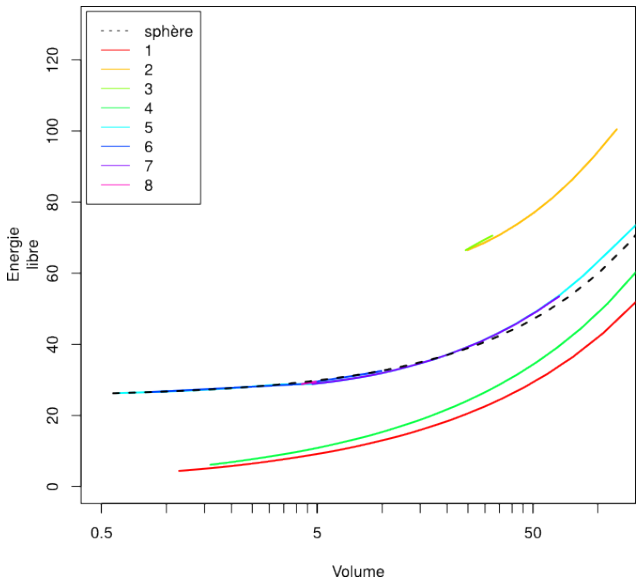


FIGURE 3.12 – Énergie des formes en fonction du volume pour $\sigma_b/\sigma_c = 0.1$.

3.3.2 Modèle complet

Dans ce modèle, on relâche l'hypothèse de rigidité totale de la bicouche. On s'intéresse dans un premier temps à l'étude de la stabilité des formes et dans un second temps à l'impact de la rigidité sur les formes, notamment dans le cas où les monocouches ont des caractéristiques identiques.

La recherche des formes est légèrement différente dans ce modèle car il est important de prendre en compte le couplage des trois membranes au niveau du point de raccord mais repose sur les principes décrits dans la section 3.2.3.

Étude de stabilité

Comme observé dans la section précédente, la forme symétrique devient métastable pour certains volumes et certaines valeurs de σ_b/σ_c. La zone rouge claire de la figure 3.14 présente le domaine métastable dans lequel la sphère a une énergie plus faible que la forme symétrique.

La figure 3.15 présente l'énergie de plusieurs formes en fonction du volume de la goutte. On constate notamment que la forme symétrique est stable pour des petits volumes. Deux formes apparaissent ensuite pour des volumes plus grands dont l'une correspond à la sphère et l'autre à une forme asymétrique. Lorsque le volume augmente, la sphère devient plus favorable que la forme symétrique. La forme asymétrique évolue ensuite vers la forme symétrique jusqu'au point b. Pour des volumes plus grands, au point c, une nouvelle forme asymétrique apparaît. Ce type de comportement est caractéristique de bifurcations supercritiques de type fourche. Les formes asymétriques sont des points selles de l'énergie et sont donc instables. Le point b de la figure 3.15 correspond au point

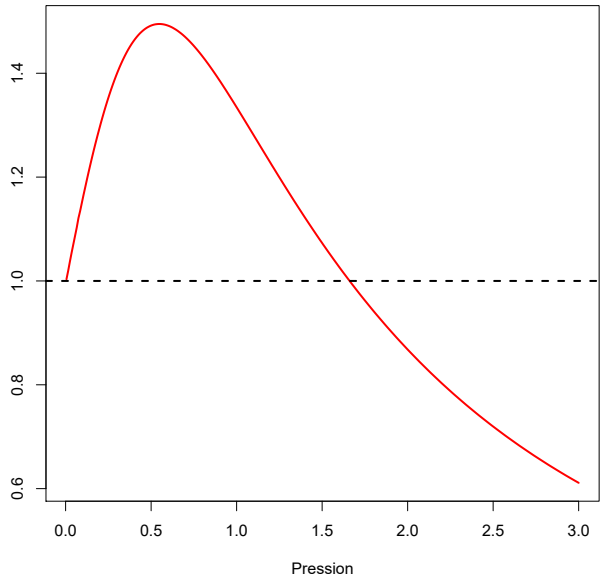


FIGURE 3.13 – Ratio de l'énergie libre à pression fixée de la forme 1 et de la sphère pour $\sigma_b/\sigma_c = 0.01$.

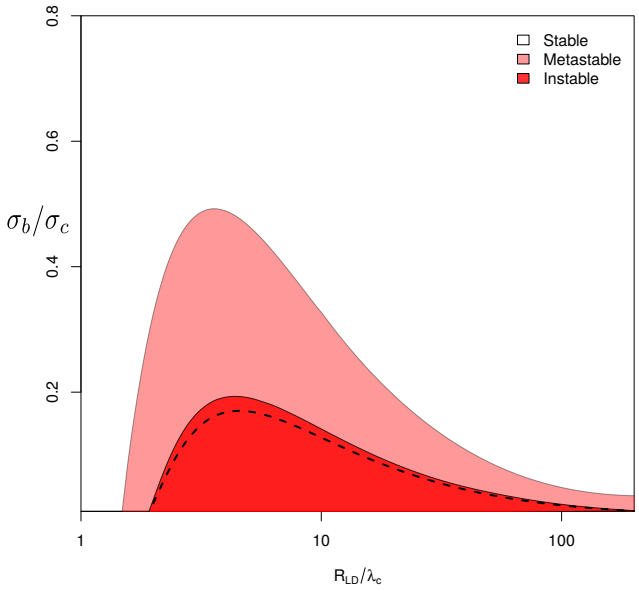


FIGURE 3.14 – Domaines de stabilité de la forme symétrique en fonction de σ_b/σ_c pour $\kappa_b/\kappa_c = 2$. L'abscisse, en échelle logarithmique, donne le rayon équivalent de la goutte, c'est à dire le rayon de la sphère de même volume. La zone rouge claire correspond au domaine de métastabilité de la forme symétrique et la zone rouge foncée au domaine ou la forme symétrique est instable. La courbe en pointillés correspond à la limite de la zone instable pour $\kappa_b/\kappa_c = 10$.

d'inversion du signe de $\frac{\partial A_l}{\partial \sigma_l}$, ce qui confirme que la forme devient instable. Lorsqu'elles fusionnent avec la forme symétrique, celle-ci devient instable à son tour.

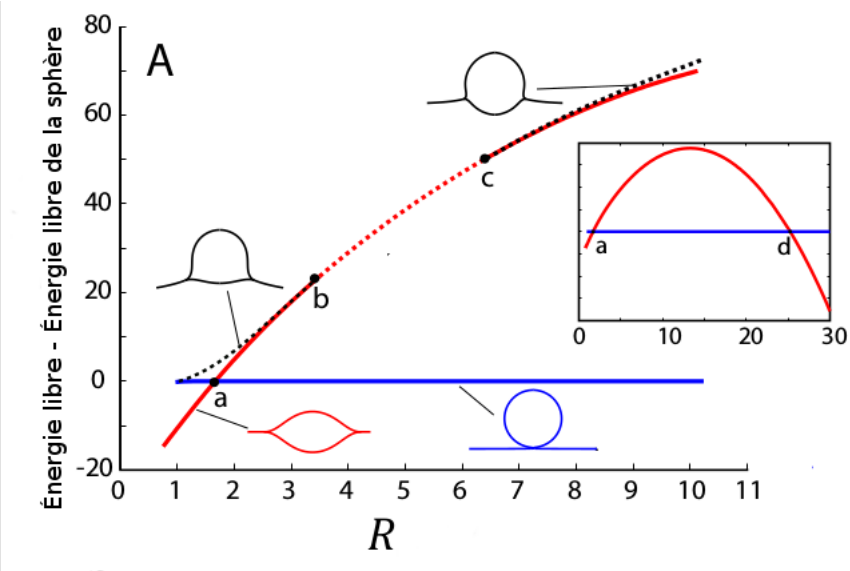


FIGURE 3.15 – Différence d'énergie entre plusieurs formes et la sphère de même volume en fonction du rayon équivalent. Au point a, la sphère a une énergie plus faible que la forme symétrique. Entre les points b et c, la forme symétrique est instable. Enfin, la sphère est plus énergétique que la forme symétrique après le point d.

La figure 3.14 présente le domaine d'instabilité de la forme symétrique en rouge foncé. L'apparition de cette instabilité suggère que dans certaines conditions de tension et de volumes, la forme symétrique n'est pas observable. La forme observée dans ces conditions est alors la forme sphérique. Cette instabilité est à l'origine du phénomène de bourgeonnement.
Dans la zone rouge claire de la figure 3.14, la forme symétrique est métastable. Dans cette zone, une barrière d'énergie de l'ordre de grandeur de quelques κ_c empêche la transition spontanée vers la forme sphérique. En revanche, dans la partie rouge foncée, lorsque le ratio σ_b/σ_c est suffisamment petit, la forme sphérique est instable et ne peut pas être observée. Dans cette région, il y une transition spontanée de la forme symétrique vers la forme sphérique. Ce phénomène résulte d'effets conjoints de la tension et de la rigidité des membranes. En effet, la tension favorise la forme sphérique tandis que la déformation des monocouches, d'énergie $\sim 16\pi\sqrt{\kappa_c\sigma_c}R$ [Foret, 2014], induites par la jonction des membranes tend à déstabiliser la forme symétrique [Deslandes et al., 2017].

La figure 3.16 présente l'évolution de la forme de la goutte lorsque le volume augmente. On constate que la forme est initialement symétrique et très allongée, puis que son rapport hauteur/largeur augmente. Enfin, passée la frontière de stabilité, la forme devient sphérique.

Un tel modèle présente donc les caractéristiques d'un bourgeonnement contrôlé par des différences de tension entre les monocouches et la bicouche. L'importance de ce phénomène et les implications pour la biologie seront discutés dans la section 3.3.7.

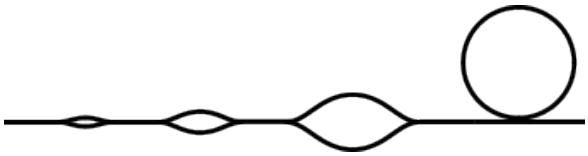


FIGURE 3.16 – Évolution de la forme stable dans le modèle ou les deux monocouches ont les mêmes propriétés.

Effet de la rigidité

De façon similaire à ce qu'on observe dans le cas où la bicouche est complètement rigide, on observe plusieurs formes possibles à un volume donné. La figure 3.17 présente quelques formes (analogues aux formes 1, 2 et 7, de la figure 3.10), pour plusieurs valeurs de κ_b/κ_c. On constate notamment que les formes B et C, qui sont symétriques, ont bicouches complètement plates, quelle que soit la valeur de κ_b/κ_c. En revanche, la forme A n'est pas symétrique (la forme mirroir de cette forme est aussi solution) et la bicouche présente une certaine déformation. Cependant, la différence d'énergie entre les formes pour plusieurs valeurs du module de rigidité reste très faible, de l'ordre de 1%.

La différence de rigidité entre les membranes a une influence assez faible sur la stabilité, comme l'indique la courbe en pointillés de la figure 3.14 qui délimite la zone instable pour $\kappa_b/\kappa_c = 10$. En effet, lorsque le ratio κ_b/κ_c diminue, on constate que la zone instable grandit légèrement. La rigidité n'affecte donc pas fortement la phénoménologie.

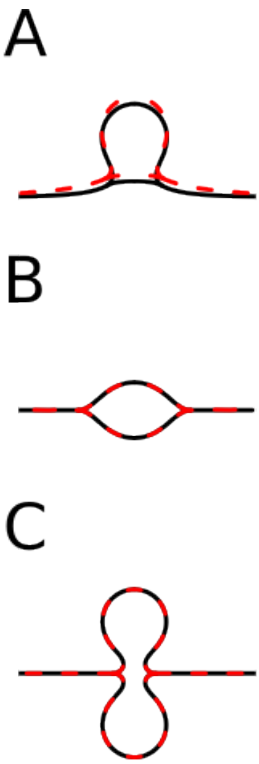


FIGURE 3.17 – Quelques formes calculées dans le modèle à trois membranes. Les formes en noir correspondent à une rigidité $\kappa_b/\kappa_c = 10$ et les formes en rouge à une rigidité $\kappa_b/\kappa_c = 1.5$.

3.3.3 Modèle avec monocouches différentes et bicouche infiniment rigide

L'asymétrie est un phénomène très souvent mentionné dans l'étude des phénomènes de bourgeonnement en biologie et notamment pour l'étude du bourgeonnement des corps lipidiques [Thiam and Forêt, 2016]. La section précédente présente un modèle avec des monocouches symétriques, qui présente une instabilité conduisant au bourgeonnement. Ce phénomène, régi principalement par la différence de tension entre les monocouches et la bicouche, peut survenir d'un côté ou de l'autre en raison de la symétrie des monocouches. Il est donc naturel de relâcher l'hypothèse de symétrie de tension des deux monocouches afin de pouvoir expliquer une direction privilégiée de bourgeonnement.

Dans ce modèle, on considère une asymétrie entre les deux monocouches :

$$\sigma_c \neq \sigma_l \tag{3.50}$$

On s'intéresse plus particulièrement à l'effet d'une telle asymétrie sur la forme et sur la stabilité des solutions. Dans ce modèle, on peut conserver les mêmes méthodes pour calculer les formes, c'est à dire : Axe $\rightarrow$ Bord et Bord $\rightarrow$ Axe.

L'existence de deux solutions sphériques différentes est l'une des différences majeures avec le cas où les monocouches sont identiques. Naturellement, la sphère formée par la monocouche avec la tension la plus faible sera d'énergie plus faible, comme l'indique les Figures 3.18 et 3.19.

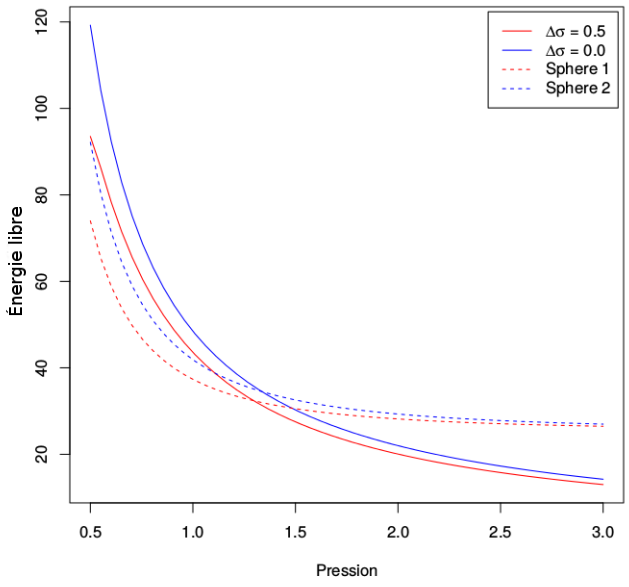


FIGURE 3.18 – Énergies de la forme de type 1 en fonction de la pression pour deux différences de tension (rouge et bleu).

La figure 3.20 montre que la forme, qui est analogue à la forme 1 de la Figure 3.10, est asymétrique, avec une plus large partie de son volume dans la partie où la tension est plus faible. Naturellement, plus l'asymétrie de tension est grande, plus l'asymétrie de la

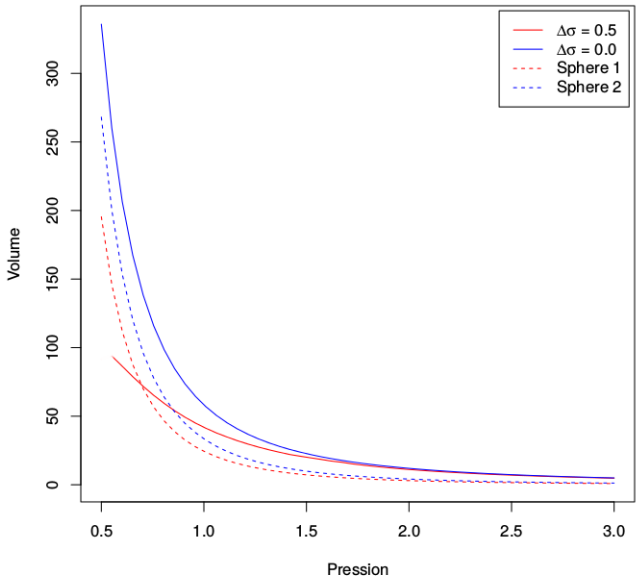


FIGURE 3.19 – Volume de la forme de type 1 en fonction de la pression pour deux différences de tension (rouge et bleu).

forme est importante. On constate notamment qu'une asymétrie de tension, même légère, peut entraîner une asymétrie importante de la forme pour de grands volumes.

3.3.4 Tension de ligne

Les variations d'énergie libre d'un système avec une ligne de contact, comme une goutte posée sur un substrat, présentent trois composantes, une composante de volume, une composante de surface et une composante de bord. Ainsi, la variation d'énergie peut s'écrire :

$$\delta\mathcal{F} = PdV + \sigma dS + \tau dL \tag{3.51}$$

Par analogie avec la tension de surface σ, on peut interpréter la tension de ligne τ comme l'excès d'énergie libre par unité de longueur de la ligne de contact.
Pour des gouttes suffisamment grandes, le terme de tension de ligne peut être négligé, on trouve alors des relations comme la loi d'Young (3.4). Cependant, pour des gouttes de petites tailles, les variations de la ligne de contact peuvent être de l'ordre de grandeur de la goutte, et cette contribution n'est plus négligeable. Ainsi, dans cette situation, on peut obtenir une relation analogue à la loi d'Young mais faisant intervenir un terme de tension de ligne [Schimmele and Dietrich, 2009] :

$$\cos\theta = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\sigma} - \frac{\tau}{\sigma R} \tag{3.52}$$

Où les notations sont celles de l'équation (3.4) et R est le rayon de courbure du bord de la goutte. Il se peut que des effets de courbure de l'interface de l'ordre de grandeur des contributions de la ligne de contact interviennent et cette définition n'est alors plus valide. Cela entraîne alors une tension de ligne effective et explique les difficultés de mesure de la tension de ligne.

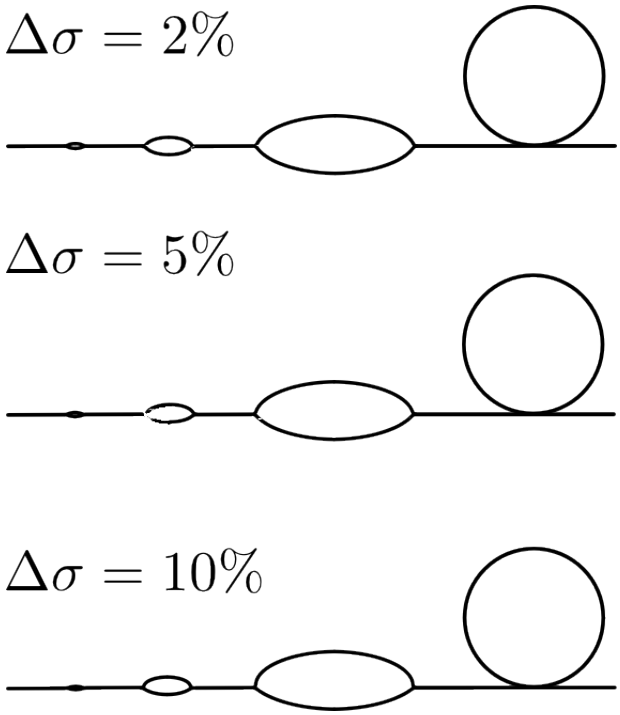


FIGURE 3.20 – Évolution de la forme stable dans le modèle où les deux monocouches ont des propriétés différentes.

Dans notre, cas, la tension de ligne correspond à la contribution de la ligne de contact. Les effets liés aux courbures des interfaces sont pris en compte dans les autres termes de l'énergie libre. Pour des tensions de ligne allant jusqu'à des ordres de grandeurs de $100pN$, le diagramme de phase est très peu affecté par la tension de ligne.

3.3.5 Courbure spontanée

L'influence de la courbure spontanée est similaire à celui de la tension dans le cas où la courbure spontanée imposée ne peut être atteinte, [Lipowsky, 2013]. En effet, le terme d'énergie de courbure (3.7) (sans le terme de courbure gaussienne) peut s'écrire sous la forme :

$$E_{courbure} = \int \left[\frac{\kappa}{2}H^2 - \frac{\kappa}{2}HC_0 + \frac{\kappa}{2}C_0^2\right] dA \tag{3.53}$$

Le terme $\frac{\kappa}{2}H^2$ a la dimension d'une tension et on peut alors considérer, en supposant que la membrane est presque plate et que $|H| \ll |C_0|$, que la membrane est soumise à une tension effective :

$$\sigma_{eff} = \frac{\kappa}{2}H^2 + \sigma \tag{3.54}$$

Où σ représente la tension superficielle de la membrane.

La courbure spontanée peut favoriser le bourgeonnement en favorisant la forme sphérique mais aussi en modulant la tension de surface. Le phénomène de modulation de la tension de surface peut aussi être moteur dans le choix de la direction de bourgeonnement.

3.3.6 Différences de pressions

Les résultats précédents sont présentés dans l'hypothèse où la différence de pression entre le lumen et le cytosol du réticulum endoplasmique est nulle. Cette hypothèse repose sur la valeur de la longueur caractéristique $\lambda_b = \sqrt{\frac{\kappa_b}{2\sigma_b}}$ qui est beaucoup plus élevée que pour les monocouches. Cette grandeur correspond à la plus petite longueur à laquelle on peut observer une déformation. En utilisant la loi de Laplace (3.1), on trouve pour $p_b = P_l - P_c = \frac{\sigma_b}{\lambda_b} \simeq 0$, ce qui suggère que la différence de pression entre le lumen et le cytosol est négligeable devant la surpression de la goutte.

3.3.7 Interprétation des résultats

Les modèles considérés dans ce chapitre présentent un phénomène de bourgeonnement spontané basé sur l'existence d'une différence de tension des membranes entourant la goutte de lipides neutres et de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce phénomène, intrinsèquement lié à la configuration du problème de bourgeonnement des corps lipidiques, diffère des phénomènes de bourgeonnement classiques. D'une part, il présente un caractère spontané, lié à l'apparition d'une instabilité, et d'autre part, il ne nécessite pas la présence d'agents extérieurs affectant les propriétés des membranes. Certains auteurs mentionnent des différences de tension en lien avec les phénomènes de bourgeonnement [Dmitrieff and Nédélec, 2015], mais la différence de tension est un élément favorisant le bourgeonnement plutôt qu'un élément directement moteur.

Le problème du bourgeonnement des corps lipidiques depuis le réticulum endoplasmique présente de nombreuses analogies avec les modèles présentés. D'une part, il est généralement admis que les lipides neutres s'agrègent entre les deux feuillets du réticulum endoplasmique. L'ouverture des deux feuillets de la membrane du réticulum endoplasmique par la présence des lipides neutres génère deux nouvelles interfaces (lipides neutres/cytosol et lipides neutres/lumen du réticulum endoplasmique), formés par des monocouches. Les propriétés de ces membranes sont très différentes de celle de la bicouche. D'une part, elle ont des rigidités inférieures à celle de la bicouche ($\kappa_{c,l} = 4 \cdot 10^{-20} J \leq 2\kappa_b$) et d'autre part, elles ont des tensions largement supérieures à celle de la bicouche ($\sigma_{c,l} = 10^{-3} N.m^{-1}$ et $\sigma_b = 10^{-4} - 10^{-5} N.m^{-1}$). La différence de rigidité s'explique par la différence d'épaisseur des membranes et l'arrangement des lipides membranaires. La présence d'une monocouche de phospholipides à l'interface entre la phase fluide de lipides neutres et la phase aqueuse du cytosol permet de réduire fortement l'énergie interfaciale en limitant les interactions entre les molécules de chacune des phases. Cependant, les lipides neutres interagissent toujours avec l'interface, c'est pourquoi la tension d'une monocouche à l'interface entre une phase de lipides neutre et une phase aqueuse est plus grande que celle d'une bicouche à l'interface entre deux phases aqueuses.
Avec ces différences de tension et de rigidité, le modèle suggère que l'instabilité survient pour des gouttes ayant un rayon équivalent d'environ $20 - 100nm$. Naturellement, de nombreux facteurs peuvent influer sur cette taille comme la présence de protéines ou la composition locales des membranes. Cette échelle est proche des limites de l'approche par des modèles continus et l'exploration par des modèles de type *coarse-grained* pourrait permettre de confirmer les résultats

Il est important de noter que le modèle prédit le bourgeonnement de la goutte mais pas son détachement du réticulum. Ainsi, la goutte, même après bourgeonnement, peut

continuer de se remplir de lipides neutres à travers un fin canal avec le réticulum endoplasmique. En effet, le coût énergétique d'un tel canal est très faible. Il n'est pas possible de décrire un éventuel détachement du réticulum avec ce modèle.

La présence d'asymétrie est généralement évoquée dans les phénomènes de bourgeonnement et de création de vésicules. Dans le modèle considéré, l'existence d'une asymétrie, même légère, de tension ou de composition (induisant par exemple une courbure spontanée) est un élément qui favorise une direction de bourgeonnement. L'existence d'une direction privilégié de bourgeonnement des corps lipidiques vers le cytosol, peut être expliquée par ce modèle. En effet, le modèle prédit qu'une légère asymétrie entre les deux monocouches privilégie une direction de bourgeonnement. Dans les graines de plantes, la présence de protéines telle que les oélosines à l'interface réticulum/cytosol [Murphy, 1993, Loer and Herman, 1993] pourrait expliquer l'asymétrie. En effet, la présence de ces protéines peut imposer une courbure spontanée à la membrane et ainsi abaisser sa tension effective, favorisant le bourgeonnement vers le cytosol.

Le caractère spontané du bourgeonnement prédit par ces modèles suggère que la présence de protéines n'est pas nécessaire au bourgeonnement. Cependant, les protéines peuvent avoir un rôle régulateur. En effet, elles peuvent modifier les propriétés des membranes et favoriser ou défavoriser le bourgeonnement. Elles peuvent aussi avoir un rôle régulateur dans la nucléation des gouttes en favorisant l'accumulation de lipides neutres sur certains sites précis.

Enfin, le phénomène de bourgeonnement peut aussi être la cause de la présence de certaines protéines sur les corps lipidiques. Il agirait ainsi comme un moyen de recruter certaines protéines favorisées par la présence de courbure au niveau de la goutte.

Chapitre 4

Analyse d'images de corps lipidique et détection d'événements de fusion

Contents

4.1 Imagerie confocale des CLs d'A. thaliana 70
4.1.1 Imagerie des corps lipidiques 70
4.1.2 Production des jeux de données 71
4.2 Méthode de segmentation 72
4.2.1 Panorama des méthodes de segmentation 72
4.2.2 Caractéristiques des objets à détecter et méthode 72
Filtre médian 74
Gradient morphologique 76
Détection des minima locaux 76
Watershed morphologique 77
4.2.3 Résultats 78
4.3 Algorithmes de suivi automatique 78
4.3.1 *Plus proche voisin* 80
4.3.2 Tests multi-hypothèses et associations probabilistes 80
4.3.3 Méthodes par résolution de problèmes d'optimisation 80
4.3.4 Application et résultats 82
4.4 Détection d'événements 83
Détection d'événements de fusion 87
4.4.1 Méthode statistique pour détecter des événements de fusion . . 88
4.4.2 Méthode heuristique pour détecter les fusions 91
4.4.3 Comparaison et résultats 93
Données synthétiques 93
Comparaison des méthodes 93
Application aux données de corps lipidiques 97

Ce chapitre présente un travail de détection d'événements de fusion de corps lipidiques à partir d'images de microscopie confocale. Ce chapitre présente dans un premier temps

un panorama des techniques d'observations des corps lipidiques et une brève description du protocole mis en place pour obtenir les données. Ces données ont été produites par Bertrand Dubreucq et Martine Miquel de l'Institut Jean-Pierre Bourgin. Les deux parties suivantes traitent des méthodes de segmentation et de suivi d'objets dans des images en biologie et présentent les méthodes mises en place pour détecter et suivre les corps lipidiques. Enfin, une procédure de détection des événements de fusion est mise en place, évaluée à partir de données simulées et appliquée aux images de corps lipidiques.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation à la conférence *IFAC-FOSBE*, [Deslandes et al., 2016].

4.1 Imagerie confocale des CLs d'A. thaliana

4.1.1 Imagerie des corps lipidiques

Les lipides ont une importance centrale dans de nombreux processus biologiques et dans de nombreuses pathologies. Le développement de techniques de quantification comme la lipidomique [Zhao et al., 2015] permettent de quantifier les lipides présents dans des tissus et d'isoler leurs rôles dans des processus biologiques spécifiques. Cependant, l'information à l'échelle des corps lipidiques n'est pas disponible et l'effet de la localisation, de la taille et de la composition des corps lipidiques ne peut pas être exploré par ces techniques [Daemen et al., 2015]. La microscopie permet en revanche d'explorer les corps lipidiques à des échelles très petites et est ainsi largement utilisée pour les étudier.

On utilise généralement la microscopie confocale [Miquel et al., 2014, Long et al., 2012, Capus et al., 2015, Jüngst et al., 2013] car elle permet d'obtenir des représentations tridimensionnelles des corps lipidiques avec des résolutions de l'ordre de $180nm$. En général, on utilise un colorant fluorescent qui se fixe aux lipides et émet un signal lumineux après excitation par un laser. La possibilité d'observer les échantillons sur des longues périodes ainsi que d'explorer la dynamique des processus biologiques est un avantage par rapport à la microscopie électronique (TEM, SEM). En effet, celle-ci permet pourtant une résolution inférieure à $10nm$ mais nécessite de fixer les échantillons, ce qui rend impossible le suivi temporel.

Les colorants fluorescents généralement utilisés pour observer les lipides à l'intérieur des cellules non fixées sont le *rouge de Nil* et le *Bodipy 493/503*. L'utilisation de tels fluorophores présente cependant certains désavantages. D'abord, ils peuvent avoir un impact sur le comportement des corps lipidiques. Ensuite, la perte de fluorescence après de longues périodes d'excitation empêche l'observation sur de très longues périodes. Enfin, les fréquences d'émission de ces fluorophores peuvent empêcher leur utilisation en conjonction avec d'autres marqueurs comme la GFP. C'est pourquoi la recherche de fluorophores plus performants est un domaine de recherche actif [Kuntam et al., 2015].

Certaines techniques de microscopie confocale (CARS et SRS) permettent l'observation sans utiliser de marqueurs. Il est alors possible d'observer des échantillons sur des très longues périodes (jusqu'à une semaine) sans détérioration de la qualité du signal et sans perturber le système biologique. Ces techniques présentent cependant des résolutions plus faibles (de l'ordre de $300-500nm$) que la microscopie confocale par fluorescence.

Les techniques de microscopie super-résolution permettent d'observer des détails de

Génotype	Jour après la floraison	Durée (Heure)	Taille de la zone d'observation ($\mu m \times \mu m \times \mu m$)
col0	9	2.5	$64.5 \times 64.5 \times 8.9$
s1	9	2.5	$64.5 \times 64.5 \times 8.9$
s3	9	2	$64.5 \times 64.5 \times 8.9$
s1s3s4	9	2	$64.5 \times 64.5 \times 8.9$

TABLE 4.1 – Description des données d'imagerie confocale avec suivi temporel.

l'ordre de $30nm$. Elles sont principalement utilisées pour explorer les interactions de protéines des corps lipidiques mais pourraient aussi être utilisées pour observer la formation des corps lipidiques.

La microscopie confocale a été retenue dans la suite car elle permet l'observation d'événements dynamiques comme la fusion de corps lipidiques et fournit des observations à une échelle intéressante pour la modélisation des distributions de volumes de corps lipidiques.

4.1.2 Production des jeux de données

Les jeux de données sont produits avec un protocole similaire à celui présenté dans [Miquel et al., 2015] :

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* utilisés sont cultivés en serre avec des jours de 13h à 25°C (17°C pour les nuits) et irrigués avec des solutions minérales.

Les embryons utilisés proviennent de siliques prélevées à 9 jours après la floraison. Les graines sont extraites des siliques puis imbibées de colorant. Le colorant, du rouge de Nil, cible les lipides neutres et a une longueur d'onde d'émission supérieure à $530nm$. Les embryons sont ensuite séparés des téguments de la graine puis observés après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité.

Le microscope confocal utilisé est un Leica SP5 II. La longueur d'onde d'excitation est de $480nm$. La zone d'observation a une taille de $64 \times 64 \times 8\mu m^3$ et la dimension d'un pixel est de $0.09 \times 0.09 \times 0.16\mu m^3$. L'observation est effectuée sur chaque embryon toutes les cinq minutes environ pendant une durée d'approximativement deux heures. Chaque observation conduit à une série de 60 images 512×512 pixels, chaque image correspondant à une section pour une profondeur donnée de la zone d'observation.

En général, l'observation est effectuée sur le bord d'un embryon. De plus, il faut noter que les embryons peuvent dériver, c'est à dire se déplacer au cours de l'observation. Ainsi, la section de l'embryon observée n'est pas nécessairement identique à chaque pas de temps. L'excitation par le laser peut entraîner une perte de fluorescence liée à l'excitation prolongée des molécules fluorescentes.

Dans la suite, on traitera les données obtenues pour différents génotypes. Le tableau 4.1 présente les données utilisées. Les mutants n'expriment pas les oléosines indiquées par leur nom. Par exemple, le mutant $s_1 s_3$ n'exprime pas les oléosines s_1 et s_3.

4.2 Méthode de segmentation

L'observation joue un rôle fondamental dans la compréhension des processus biologiques. L'utilisation des techniques de microscopie permet d'explorer à de petites échelles les processus biologiques, afin de mieux comprendre les relations entre génotype et phénotype. La microscopie permet d'observer des organelles et des protéines afin de comprendre leurs interactions, leurs mouvements et leurs fonctions. Pour bien comprendre et analyser les jeux de données d'imagerie produits, il est nécessaire de mettre en place des techniques efficaces et robustes afin d'extraire les informations pertinentes. Cette section présente une brève présentation des techniques couramment utilisées et décrit la méthode retenue pour segmenter les images de corps lipidiques.

4.2.1 Panorama des méthodes de segmentation

Les objets biologiques observés par microscopie peuvent présenter de nombreuses formes. Ces formes diffèrent en fonction du système considéré (vésicules, microtubules, membranes, protéines), de la technique utilisée ou encore du type de marquage.

Pour détecter des objets d'intérêt dans des images de biologie cellulaire, trois types de méthodes sont couramment utilisés :

— Détection d'extrema : les objets sont identifiés à partir de points extrémaux.

— Seuillage : les objets sont identifiés par le contraste qu'ils forment avec le fond.

— Ajustement : les objets sont identifiés à partir de recherche de formes ou de profils d'intensité spécifiques.

Ces trois méthodes ne sont pas incompatibles et il n'est pas rare de faire appel aux trois pour pouvoir mettre au point un détecteur fiable.
Généralement, la détection d'objets à partir d'images de microscopie fait intervenir des algorithmes permettant d'affecter un identifiant unique à chaque objet.

Pour pouvoir mener efficacement l'étape de détection, on a souvent recours à des prétraitements et à l'application de filtres sur les images brutes obtenues en sortie du microscope. Ce type de traitement permet de renforcer certaines caractéristiques de l'image ou d'en améliorer la qualité. En général, on cherche à réduire le bruit, augmenter le contraste ou mettre en évidence les contours des objets. Le tableau 4.2 donne un récapitulatif rapide des méthodes disponibles pour effectuer ce genre de traitement.

4.2.2 Caractéristiques des objets à détecter et méthode

Les corps lipidiques sont des objets plutôt sphériques et de tailles très hétérogènes. Il arrive que certains corps lipidiques, principalement les plus gros, soient déformés et donc plus éloignés de la forme sphérique généralement observée. Les images considérées peuvent avoir des densités d'objets variables en fonction des embryons et en fonction du temps d'observation. Certaines images présentent des corps lipidiques très proches voire qui se touchent. La figure 4.1 présente des exemples de ces situations.

Pour ces raisons, il n'est pas possible de choisir facilement une échelle propice à la détection des objets. De plus, il est difficile de définir précisément une forme pour les corps lipidiques, d'une part en raison des tailles hétérogènes, et d'autre part parce que certains corps lipidiques peuvent être déformés ou collés, ce qui complique largement la détection par ajustement d'une forme. Les méthodes de détection de bords peuvent avoir des difficultés à identifier les objets collés. Dans la suite, on choisira une méthode alliant

Pré-traitement/Filtre	Techniques
Débruitage	Ondelettes
	Flou gaussien
	Filtre de Wiener
	Filtre médian
	Filtre moyen
	Filtre adaptatif
Détection de bords	Laplacien de gaussiennes
	Différence de gaussiennes
	Gradients morphologiques
Amélioration de contraste	Déconvolution
	Ajustement d'histogramme

TABLE 4.2 – Pré-traitements et filtres classiquement utilisés pour les images de biologie cellulaire.

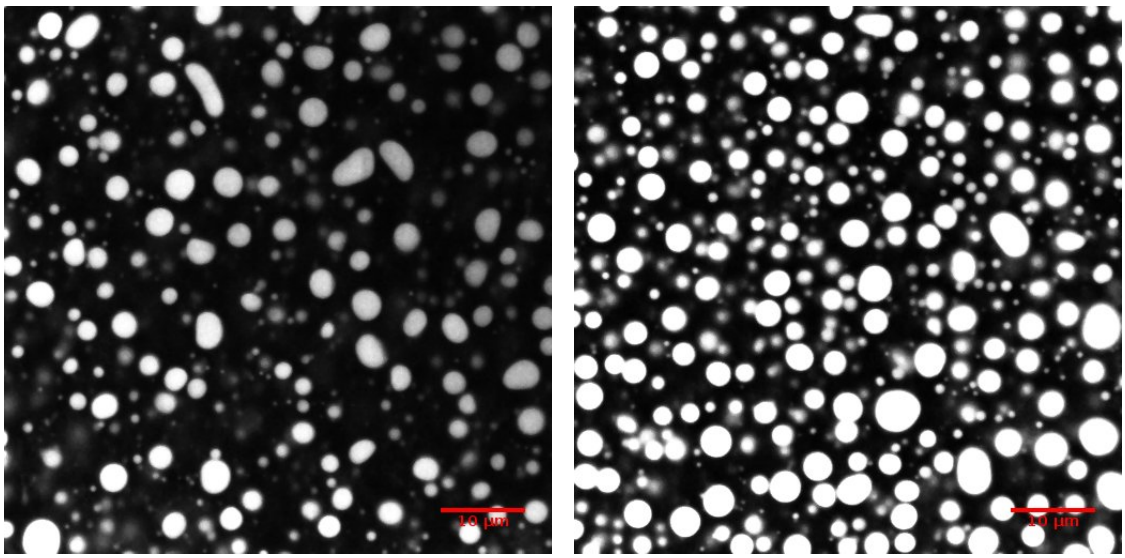


FIGURE 4.1 – Sections de deux images débruitées de corps lipidiques pour les mutants s3 (à gauche) et s1s3 (à droite).

détection de bords et recherche d'extrema afin d'une part de pouvoir identifier les objets quelle que soit leur forme (à partir du contour) et d'autre part de pouvoir séparer les objets collés (à partir de points extrémaux).

Pour segmenter les images, on applique la procédure suivante, inspirée de [Legland et al., 2016], :

1. Débruitage de l'image avec un filtre médian.
2. Détection de contours par un gradient morphologique.
3. Détection de minima locaux de l'image des contours obtenue.
4. Application d'un algorithme de watershed morphologique à partir des points extrémaux sur l'image des contours.

Les sections suivantes donnent des détails sur chaque étape du détecteur et présentent des exemples d'application sur des images synthétiques. Des détails sur les procédures issues de la morphologie mathématique peuvent être obtenus dans [Soille, 2013], par exemple.

Dans la suite, on s'intéresse à des images binaires, c'est à dire avec des valeurs dans $\{0, 1\}$ et des images à 256 niveaux de gris, c'est à dire avec des valeurs dans $\{0, 1, \cdots, 255\}$. Les images sont définies comme des applications qui associent à une grille régulière $\Omega \in \mathbb{Z}^n$, n représente la dimension, une valeur dans $\{0, 1\}$ ou $\{0, 1, \cdots, 255\}$. On a donc pour une image binaire :

$$I : \Omega \in \mathbb{Z}^n \rightarrow \{0, 1\} \tag{4.1}$$

Et pour une image en niveaux de gris :

$$I : \Omega \in \mathbb{Z}^n \rightarrow \{0, 1, \cdots, 255\} \tag{4.2}$$

Pour les images binaires, les valeurs 0 représentent l'arrière plan et les valeurs 1 représentent le premier plan. On définit l'ensemble X des points de l'image binaire I ayant pour valeur 1 de la façon suivante :

$$X = \{x \in \Omega | I(x) = 1\} \tag{4.3}$$

Filtre médian

Le filtre médian est couramment utilisé pour débruiter des images numériques. Il consiste à remplacer chaque valeur de pixel d'une image par la valeur médiane dans un voisinage du pixel considéré. Ce type de filtre est plus robuste que certaines alternatives comme le filtre moyen dans lequel on remplace la valeur du pixel par la moyenne de son voisinage. En effet, la moyenne est plus sensible aux valeurs aberrantes. Le filtre médian permet d'éliminer les valeurs extrêmes et permet notamment de conserver les contours des images.

La figure 4.2 présente les résultats d'applications de filtres médians sur des images synthétiques. On constate notamment un défaut lié aux objets collés. La séparation des objets collés est assez mauvaise car elle crée une zone "grise" au niveau de la jonction des deux objets, là où les contours sont mal définis. On verra dans la suite des manières de contourner ce problème.

Les principales alternatives à ce filtre sont les filtres moyens, la déconvolution, l'application de flous gaussiens, le filtre de Wiener et les filtres adaptatifs. La procédure de détection des corps lipidiques repose sur la détection des bords et le filtre médian a été retenu car il présente l'avantage de bien conserver les contours des objets.

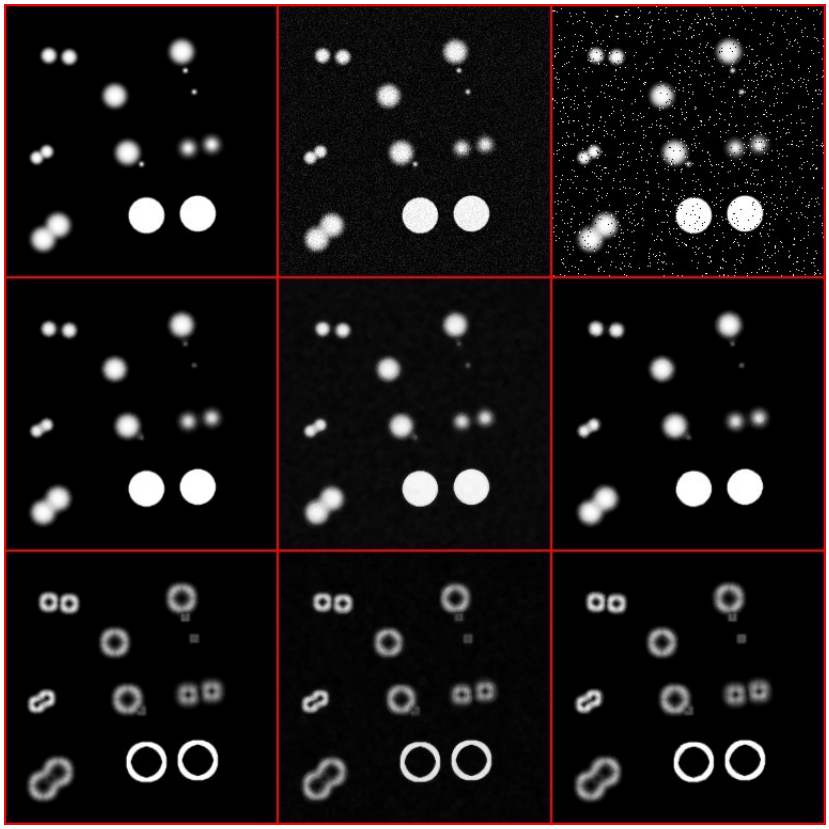


FIGURE 4.2 – Exemples de filtres médians et de gradients morphologiques appliqués sur des images synthétiques. Chaque colonne correspond à l'image originale, l'image filtrée par un filtre médian et l'image du gradient morphologique appliquée à l'image filtrée. Ces filtres sont appliqués sur une image de synthèse (en haut à gauche) et deux images bruitées.

Gradient morphologique

La morphologie mathématique repose sur la comparaison de structures inconnues à un ensemble de formes, appelées éléments structurants, à partir d'opérations booléennes. Les méthodes basées sur la morphologie mathématique considèrent les images comme des ensembles et permettent de définir des opérateurs variés. Elles sont basées sur deux opérations élémentaires : la dilatation et l'érosion. Ces opérations sont ensuite combinées afin de mettre au point des procédures de traitement plus complexes. Ces opérations sont définies, pour un élément structurant B, de la façon suivante pour une image binaire I :

$$\begin{aligned} \text{Érosion :} \quad & \varepsilon_B(I) = \{x | B_x \subseteq X\} \\ \text{Dilatation :} \quad & \delta B(I) = \{x | B_x \cap X \neq 0\} \end{aligned} \tag{4.4}$$

La notation B_x correspond à l'élément structurant centré sur le point x. Il est possible d'appliquer ces opérations à des images en niveaux de gris. On a alors pour l'image érodée, notée $\varepsilon_B(I)$ (respectivement dilatée $\delta_B(I)$) :

$$\begin{aligned} \text{Érosion} : [\varepsilon_B(I)](x) &= \underset{b \in B}{min} I(x+b) \\ \text{Dilatation} : [\delta_B(I)](x) &= \underset{b \in B}{max} I(x+b) \end{aligned} \tag{4.5}$$

La figure 4.3 présente une application de l'érosion et de la dilatation sur une image synthétique.

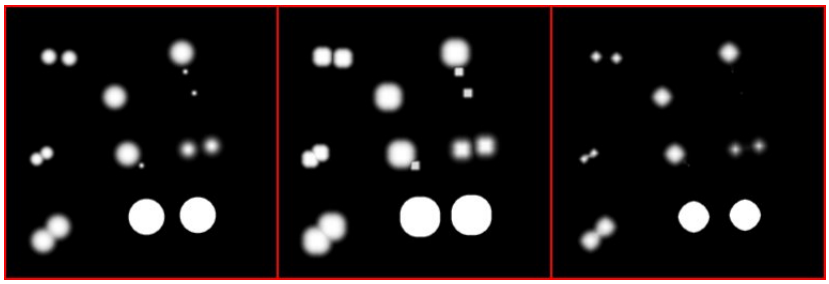


FIGURE 4.3 – Application de l'érosion (droite) et de la dilatation (milieu) sur une image synthétique (gauche) de 256×256 pixels. L'élément structurant est un carré de rayon 2 pixels.

La combinaison de ces opérations permet de mettre au point différents filtres. En particulier, les filtres de type gradient morphologique permettent de mettre en évidence les contours des objets contenus dans une image, voir figure 4.2. Il existe plusieurs types de gradients, en fonction des opérations élémentaires utilisées. Pour le détecteur de corps lipidiques, on utilise le filtre gradient suivant :

$$\text{grad}I(x) = [\delta_{B_1}(I)](x) - [\varepsilon_{B_2}(I)](x) \tag{4.6}$$

On utilise ici deux éléments structurants B_1 et B_2 différents.

Détection des minima locaux

Les minima régionaux sont les ensembles connexes de pixels tels que l'intensité des pixels situés sur la frontière extérieure est strictement plus grande que celle des pixels de l'intérieur.

Il est possible en pratique de filtrer ces minima à partir du contraste de l'image afin d'obtenir les minima qui sont suffisamment profonds. Cette procédure fait intervenir des opérations morphologiques géodésiques. Les opérations géodésiques sont définies à partir d'une image de référence I et d'un masque M (qui est une image vérifiant : $I(x) \leq M(x)$). La dilatation géodésique, $[\delta^{\text{géo}}_{B,M}(I)]$, est définie pour une image I et un marqueur M, par :

$$[\delta^{\text{géo}}_{B,M}(I)](x) = min([\delta_B I](x), M(x)) \tag{4.7}$$

L'érosion est définie de manière duale par :

$$[\varepsilon^{\text{géo}}_{B,M}(I)](x) = max([\varepsilon_B(I)](x), M(x)) \tag{4.8}$$

L'application itérée de la dilatation géodésique s'appelle la reconstruction géodésique par dilatation. Il existe un certain rang à partir duquel l'image ne change plus, on parle alors de stabilité.

On peut calculer les minima étendus d'une image en appliquant la reconstruction géodésique par dilatation jusqu'à la stabilité. Pour cela, on utilise l'image I comme masque et l'image $I - h$ comme image de référence. Ainsi, on pourra obtenir une image où les minima régionaux auront une profondeur d'au plus h.

Dans les images de corps lipidiques, les minimas étendus sont supposés correspondre à des régions à l'intérieur des corps lipidiques. On peut se servir de ces régions, ainsi que de l'image des contours pour identifier les corps lipidiques.

Watershed morphologique

Le *watershed morphologique* est une méthode de segmentation d'objets à partir d'une image des contours des objets. Cette méthode considère l'image comme un relief topographique avec des crêtes et des vallées. Le remplissage des vallées, par analogie avec le remplissage du relief par de l'eau, conduit à l'identification des objets.

L'algorithme du *watershed morphologique* est une procédure itérative qui «remplit »les régions à l'aide de reconstructions géodésiques. On commence par identifier les minima régionaux de l'image pour une valeur de niveau initiale h, auxquels on affecte un label unique. On procède ensuite à une reconstruction géodésique avec une profondeur $h + 1$. On labellise les minima régionaux de l'image obtenue selon les règles suivantes :

- Si un minimum régional n'intersecte aucun minimum de l'itération précédente, on lui affecte un nouveau label.
- Si un minimum régional intersecte un unique minimum de l'image précédente, on lui affecte le label de ce minimum.
- Si un minimum régional intersecte plusieurs minima de l'image précédente, les pixels de cette région sont affectés aux minima de l'image précédente en fonction de leur région d'influence, c'est-à-dire en fonction de la distance qui les sépare de chaque minimum.

On applique cette procédure itérativement en augmentant la valeur de profondeur. Cet algorithme affecte à chaque objet un label unique.

Étape	Paramètre	valeur
Filtre médian	Rayon	2
Gradient	Rayon érosion	1
	Rayon dilatation	2
Détection des minimas	Rayon reconstruction	1
	Profondeur	12

TABLE 4.3 – Paramètres utilisés lors de l'application de la procédure de détection aux images de corps lipidiques.

	1^{er} quantile	Médiane	3^{e} quantile	Moyenne
Volume (μm^3)	0.376	0.658	1.671	2.227
Rayon équivalent (μm)	0.448	0.540	0.736	0.810

TABLE 4.4 – Statistiques d'une distribution de volume pour le mutant s3.

4.2.3 Résultats

Pour segmenter les corps lipidiques, on applique le gradient morphologique à l'image débruitée par le filtre médian pour obtenir une image des contours, on détecte les minima que l'on impose ensuite sur l'image des contours. Enfin, on applique l'algorithme de *watershed morphologique*. Cette procédure permet à la fois de détecter des objets de formes diverses et des objets collés. Des exemples d'application de cette procédure à des images de corps lipidiques sont donnés dans la suite.

La procédure permet de détecter des objets de tailles différentes. La figure 4.4 présente un résultat de segmentation. Le tableau 4.3 indique les paramètres utilisés pour l'application sur les images de corps lipidiques.

La segmentation des objets permet de mesurer leurs caractéristiques, notamment leur volume V et la position de leur centre de masse X, Y, Z. Les objets situés sur les bords de l'image sont retirés car les mesures des caractéristiques des objets, notamment le volume, ne sont pas fiables. Le tableau 4.4 présente quelques statistiques sur les volumes de corps lipidiques. On utilise notamment le rayon équivalent, qui correspond au rayon de la sphère de volume équivalent. Il est a partir du volume V d'un objet par :

$$R_{eq} = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \tag{4.9}$$

On constate notamment que la moyenne se situe autour de $2.2\mu m^3$, ce qui correspond à un rayon équivalent de $0.8\mu m$. On constate sur la figure 4.5, que la distribution est asymétrique. En effet, on observe beaucoup d'objets relativement petits et quelques objets très gros. Ceci explique l'écart important entre la médiane et la moyenne. Des détails sur les données dynamiques sont donnés dans la suite et une analyse plus poussée des distributions de volume est donnée dans la partie 5.

4.3 Algorithmes de suivi automatique

Les algorithmes de suivi automatique d'objets procèdent généralement en deux étapes [Meijering et al., 2009, Miura, 2005]. Dans un premier temps, on détecte les objets, puis

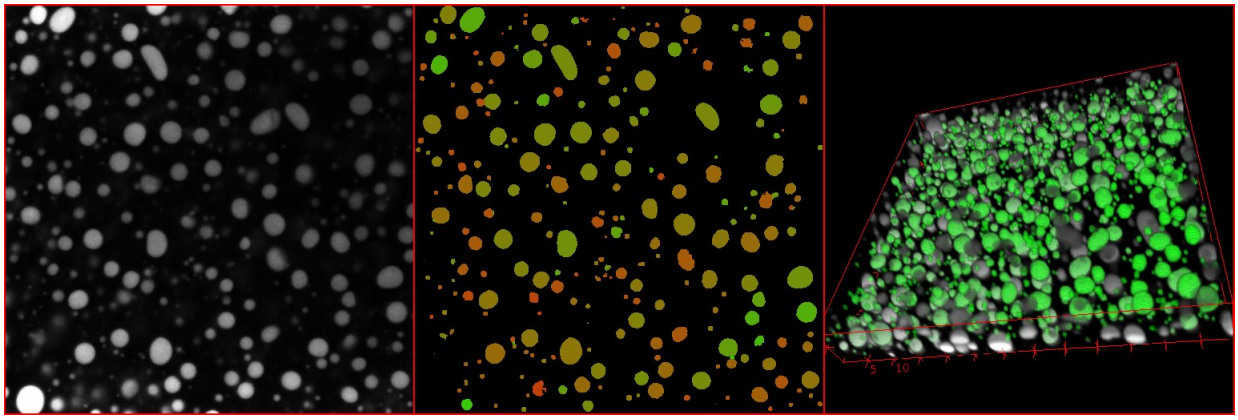


FIGURE 4.4 – Résultats de segmentation d'une image de corps lipidiques. L'image de gauche présente une section d'une image débruitée de corps lipidiques (s3). L'image des labels correspondantes est donnée au milieu. L'image de droite présente une vue 3D avec les objets segmentés en vert. Les objets en blancs ont été éliminés car ils touchent l'un des bord de la zone d'observation.

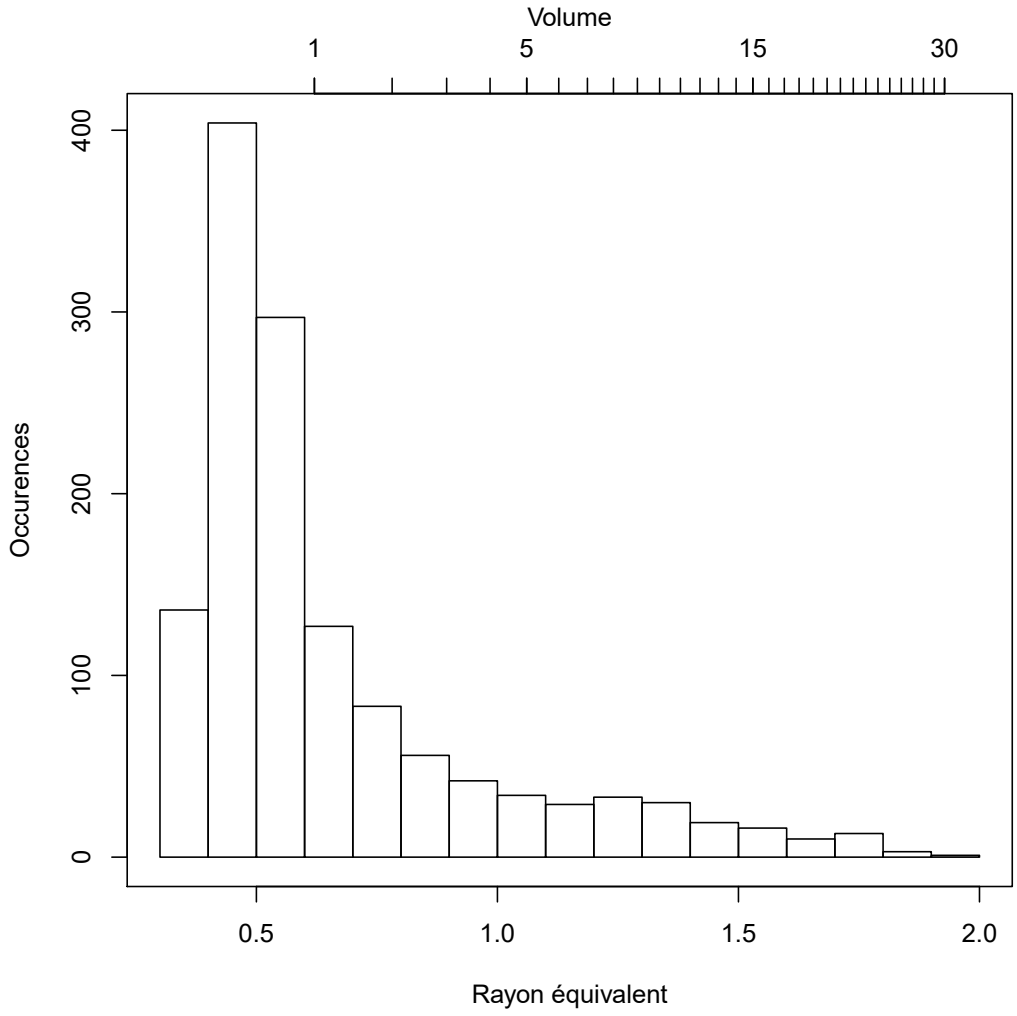


FIGURE 4.5 – Distribution des rayons équivalents (en μm) pour le mutant s3. L'axe situé en haut de la figure donne les volumes correspondants (en μ^3).

dans un second temps on réalise le suivi des objets en construisant des trajectoires. La construction des trajectoires correspond à l'association de deux objets détectés à deux temps différents. Pour mener à bien cette étape, il faut connaître les objets et leurs propriétés (notamment leurs positions). Dans cette section, on présente les différents algorithmes automatiques utilisables, en conjonction avec l'une des méthodes mentionnées précédemment pour la détection d'objets. Naturellement, il existe de nombreuses versions des algorithmes présentés ci-dessous. Des comparaisons sur données simulées ont été effectuées et ont montré qu'aucune méthode n'est universellement plus performante [Chenouard et al., 2014]. En général, le choix d'une méthode adaptée aux caractéristiques des objets et des trajectoires ainsi que l'utilisation de paramètres adaptés permet d'obtenir les meilleurs résultats.

4.3.1 *Plus proche voisin*

La méthode des *plus proches voisins* est très appréciée pour sa simplicité et sa rapidité. Elle consiste à associer chaque objet d'une image à un temps donné à l'objet le plus proche dans l'image au temps suivant. Elle est très facile d'utilisation et demande peu de ressource car le calcul des distances entre objets est une opération relativement simple et peu coûteuse. Cependant, cette technique, dans sa version la plus simple est peu efficace lorsque la densité d'objets est élevée et que le déplacement des objets est grand devant la résolution temporelle.
Il existe cependant un certain nombre de variantes qui permettent de prendre en compte le déplacement des objets et qui utilisent des modèles probabilistes pour affecter les objets entre deux images, [Miura, 2005, Chenouard et al., 2014].

4.3.2 Tests multi-hypothèses et associations probabilistes

La technique de suivi par tests d'hypothèses multiples est depuis peu utilisée en biologie. Cette technique consiste à prendre la décision d'affectation sur la base de plusieurs instants. L'énumération de toutes les trajectoires possibles sur plusieurs instants permet de sélectionner les trajectoires les plus probables et ainsi éviter les mauvaises associations. Cette méthode est très coûteuse car elle nécessite d'énumérer un grand nombre de trajectoires. Cependant, l'utilisation de stratégies d'évaluation et la parallélisation permettent de réduire fortement le coût et le temps de calcul.
Elle est généralement utilisée avec des modèles probabilistes, comme définis dans [Li and Li, 2001, Blom and Bar-Shalom, 1988, Chakravorty and Challa, 2006], sur les trajectoires qui permettent d'inclure des modèles de mouvements des objets et des événements d'apparition et de disparition. L'utilisation de techniques bayésiennes est souvent employée pour estimer l'état des trajectoires [Chenouard et al., 2009].
Cette méthode permet de mettre en place des suivis de trajectoires très fins mais repose sur la définition de nombreux paramètres qui peuvent être difficiles à déterminer.

4.3.3 Méthodes par résolution de problèmes d'optimisation

Dans les cas où les méthodes de type *plus proches voisins* ne sont pas utilisables, notamment si les trajectoires de objets se croisent, il est possible de chercher des trajectoires «optimales ». Ces méthodes affectent et comparent des coûts associés à des liens entre objets. L'affectation des objets entre deux instants nécessite la résolution d'un problème

d'optimisation.
Cette méthode est mise en œuvre dans [Jaqaman et al., 2008, Tinevez et al., 2017], dans lequel l'affectation nécessite de résoudre un problème d'affectation linéaire.

Pour chaque paire d'instants consécutifs, on souhaite apparier les objets de l'instant t à ceux de l'objet $t+1$. Il se peut aussi qu'un objet ne soit pas affecté à un autre objet. Cette situation correspond à un début ou une fin d'une trajectoire. Pour cela, on définit une matrice d'affectation A, de taille $(n+m)\times(m+n)$ où n représente le nombre d'objets à l'instant t et m le nombre d'objet à l'instant $t+1$. Cette matrice vérifie les conditions suivantes :

$$\begin{cases} A_{ij} \in \{0,1\} \\ \sum_{i=1}^{m+n} A_{ij} = 1 \quad \forall j \\ \sum_{j=1}^{m+n} A_{ij} = 1 \quad \forall i \end{cases} \tag{4.10}$$

Cette matrice a donc strictement un coefficient non nul par ligne et par colonne, correspondant à une affectation, une fin ou un début de trajectoire.

On définit ensuite une matrice de coûts C composées de quatre blocs telle que :

$$C = \begin{pmatrix} L & D \\ B & E \end{pmatrix} \tag{4.11}$$

. Les matrices L, D, B et E sont définies par :

- L : matrice des coûts d'affectation de taille $n \times m$, L_{ij} correspond au coût d'affectation de l'objet i de l'instant t à l'objet j de l'instant $t+1$.
- D, B : matrice des coûts de non affectation de taille $m \times m$ et $n \times n$ respectivement. Sur les diagonales, les D_{ii} (respectivement $B_i i$) correspondent au coûts associés à la non affectation de l'objet i de l'instant t (respectivement $t+i$), c'est à dire à une fin (respectivement début) de trajectoire. Les valeurs de B_{ij} et D_{ij} pour $i \neq j$ correspondent à des coûts impossibles (supérieur au seuil d'affectation).
- La matrice E correspond aussi à des coûts d'affectation impossible.

Les trajectoires entre les instants t et $t+1$ sont définies par la matrice d'affectation qui vérifie :

$$A^* = arg\min_A AC \tag{4.12}$$

Les coûts sont en général basés sur la distance entre les objets mais peuvent aussi faire intervenir des propriétés de l'objet (surface, volume, intensité moyenne, etc).

Cette technique est très rapide et est plus robuste que les *plus proches voisins* en cas de forte densité d'objets et de mouvements importants. Il est cependant difficile de définir les coûts, en particulier les coûts de non-affectation. Une définition de ces coûts est effectuée dans [Jaqaman et al., 2008] à partir d'un grand nombre de simulations. L'implémentation de [Tinevez et al., 2017] permet de prendre en compte des mesures de similarités entre les objets (intensité, taille, position) en ajoutant des pénalités.

4.3.4 Application et résultats

Pour les données de corps lipidiques, on utilise la méthode par affectation linéaire comme présentée dans la section 4.3.3. Elle permet de prendre en compte facilement les déplacements et est relativement rapide. De plus, il est aisé d'ajouter les informations sur les volumes des objets pour améliorer la qualité de la reconstruction des trajectoires à travers des pénalités.

Dans un premier temps, la détection des objets permet de s'intéresser aux caractéristiques des corps lipidiques. En particulier, l'étude de l'évolution des distributions de volume au cours du temps, Figure 4.6, montre que le nombre d'objets détectés n'est pas constant. En particulier, on constate que des objets peuvent apparaître et d'autres disparaître. Ce sont principalement les petits objets qui disparaissent en raison de phénomènes de photo-blanchiment. Ce phénomène correspond à la perte de fluorescence des molécules en raison de leur exposition à la lumière et touche surtout les petits objets, qui sont en général moins intenses car ils contiennent moins de molécules. La dérive de l'embryon, c'est-à-dire son déplacement spontané, est aussi une cause de disparition d'objets. En effet, le champ d'observation étant fixe, des objets peuvent entrer ou sortir du champ d'observation à cause de la dérive globale de l'embryon.

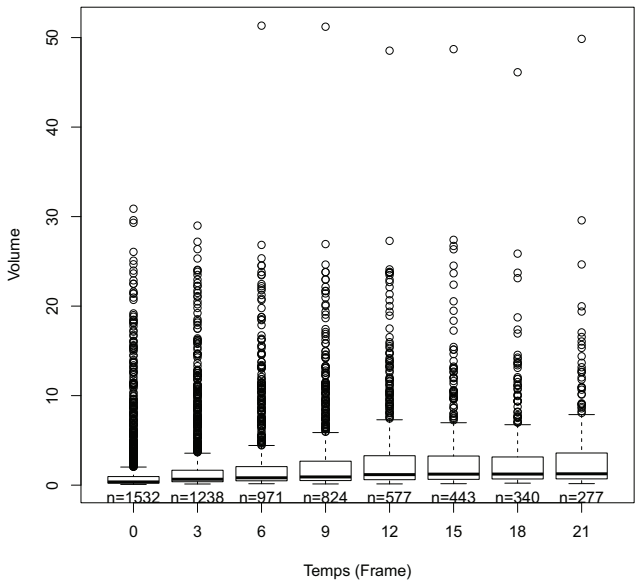


FIGURE 4.6 – Distributions des volumes des corps lipidiques à différents instants. Le nombre n correspond au nombre d'objets détectés.

L'étude du déplacement des objets le long des trajectoires, révèle l'existence d'un mouvement global lié au déplacement de l'embryon. La figure 4.7 présente les déplacements moyen par temps et révèle l'existence d'une tendance. Cette tendance correspond à la dérive de l'embryon sous la lamelle. La figure 4.8 présente l'histogramme des déplacements moyens de chaque trajectoire. On constate que la moyenne des déplacements moyens de chaque trajectoire n'est pas nulle, ce qui est lié à l'existence de la dérive, aussi observable clairement sur les images. Si l'on corrige ce déplacement, on trouve que la majeure partie

des trajectoires se déplace très peu en moyenne (plus de 95% des déplacements moyens sont inférieurs à $0.01\mu m$, ce qui est très petit devant la taille de l'image).

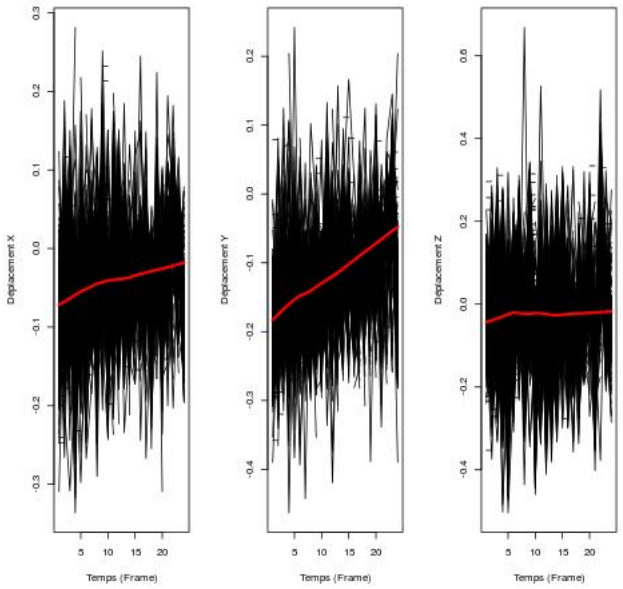


FIGURE 4.7 – Déplacements en x, y et z des objets entre deux instants au cours du temps pour chaque trajectoire. La courbe rouge est obtenue par régression polynomiale.

En corrigeant la dérive, on peut calculer les distributions des déplacements pour chaque coordonnée et la distribution des déplacements pour chaque objet, figures 4.9 et 4.10. Ainsi, on en déduit qu'entre deux instants, la majeure partie des objets se déplace d'au plus $0.3\mu m$.

Si l'on s'intéresse plus précisément aux caractéristiques des trajectoires, on constate qu'un grand nombre de trajectoires s'étendent sur peu d'instants, comme l'indique la figure 4.11. En effet, seul 50% des trajectoires s'étendent sur plus de cinq instants. Cela s'explique bien évidemment par les pertes d'objets liées au photo-blanchiment et à la sortie du champs d'observation. On constate qu'un nombre restreint de trajectoires peuvent être observées sur toute la durée d'observation. Si on considère les trajectoires en groupant les objets par tailles, on constate que les trajectoires longues concernent principalement des gros objets comme l'indique la figure 4.12.

La variance du volume sur une trajectoire a une forte dépendance à la taille des objets, comme indiqué sur la figure 4.13. Les mesures de volumes sur les plus gros objets sont soumises à un bruit plus important. Il est possible de stabiliser cette variance en appliquant une transformation du volume. L'utilisation de la transformation de Box-Cox [Venables and Ripley, 2013] indique que prendre la racine carrée du volume permet de bien stabiliser la variance, comme l'indique la figure 4.13.

4.4 Détection d'événements

La détection d'événements dans des images de microscopie permet de comprendre les relations entre les objets observés. Il existe une très grande diversité d'événements en biologie (ancrage de protéines, fusion de membranes, bourgeonnement, déplacements). En conséquence, il existe une grande diversité de techniques pour étudier ces événements.

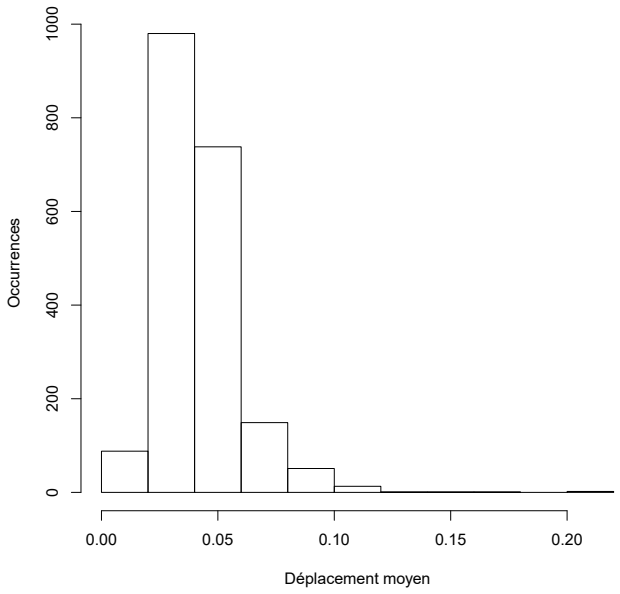


FIGURE 4.8 – Histogramme des moyennes par trajectoires des déplacements entre deux instants consécutifs.

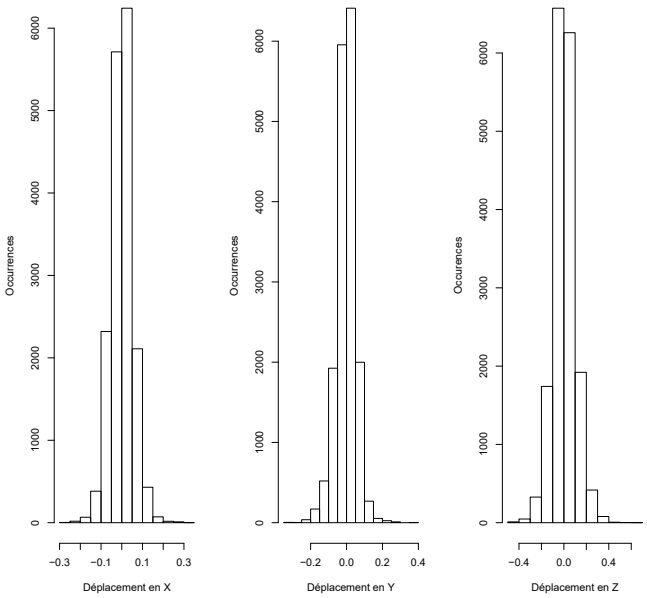


FIGURE 4.9 – Histogramme des déplacements entre deux instants consécutifs des objets pour les composantes X, Y et Z après correction de la dérive.

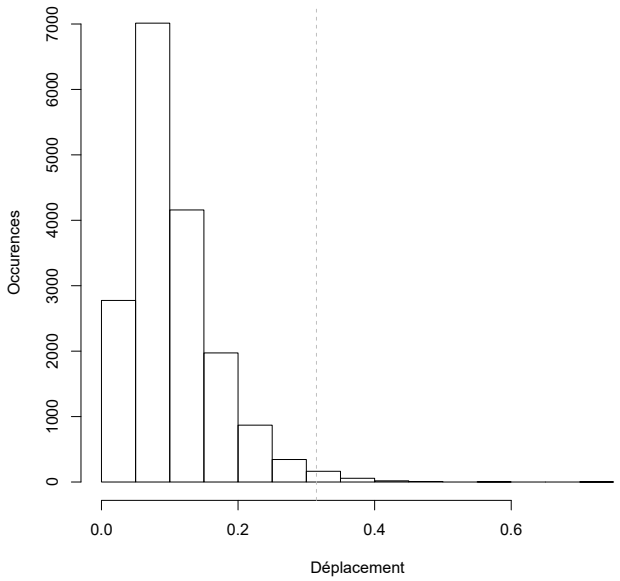


FIGURE 4.10 – Histogramme des déplacements par objets entre deux instants après correction de la dérive. La ligne verticale à $0.31\mu m$ correspond au quantile d'ordre 0.99.

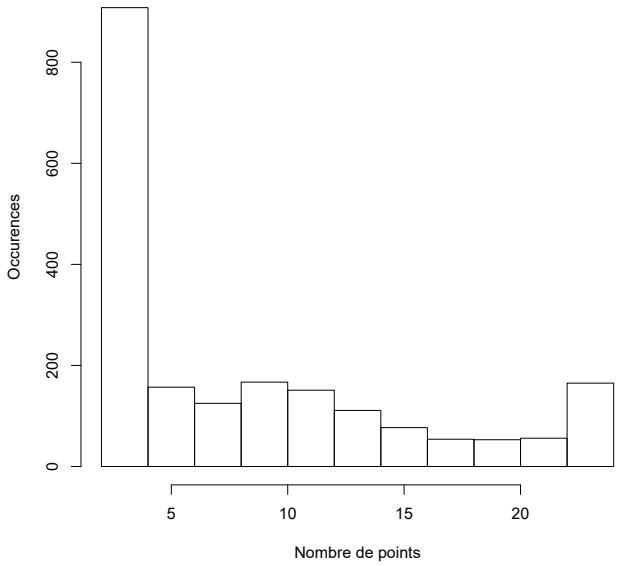


FIGURE 4.11 – Histogramme du nombre de points par trajectoire.

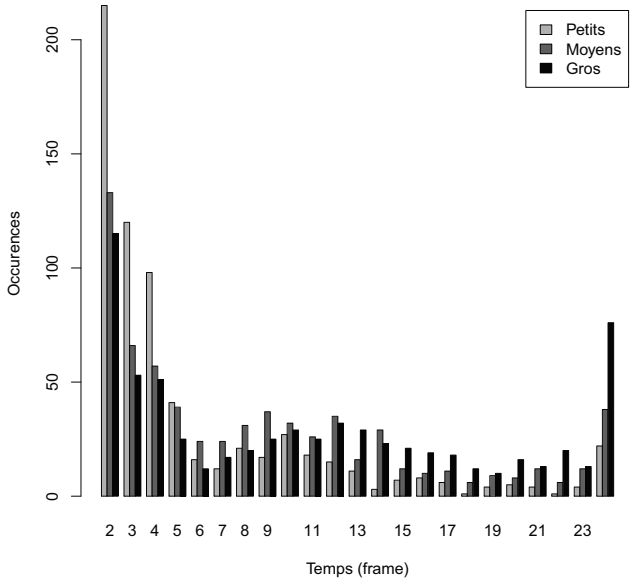


FIGURE 4.12 – Histogramme du nombre de points par trajectoires en fonction du temps pour différentes classes de taille. Les classes de tailles sont choisies en fonction des tertiles.

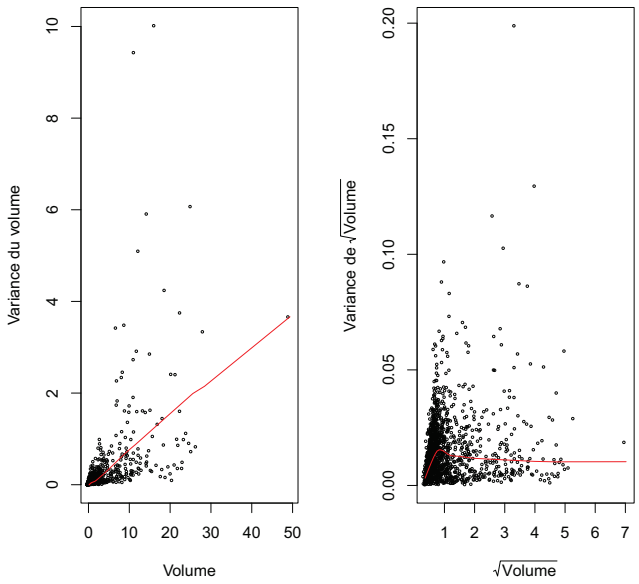


FIGURE 4.13 – Variance du volume en fonction du volume moyen par trajectoire et variance de la racine carrée du volume moyen par trajectoire. Les lignes rouges sont obtenues par régression polynomiale.

Les événements d'intérêt dans les images de corps lipidiques sont les événements de fusion et de fission [Long et al., 2012, Miquel et al., 2014]. Dans cette section, on s'intéressera uniquement aux événements de fusion. La fusion de deux corps lipidiques correspond au mélange du contenu de deux corps lipidiques. Le volume du corps lipidique résultant est égal à la somme des volumes des deux corps lipidiques ayant fusionné.

Détecter ce type d'événement est analogue à la détection de superposition de trajectoires avec la différence qu'il existe une loi de conservation du volume lors de l'événement. Les algorithmes de suivi de trajectoire qui prennent en compte les événements de superposition de trajectoire reposent en général sur des techniques d'optimisation. Dans la section suivante, on propose une adaptation au cas de la fusion de corps lipidiques de la méthode retenue dans [Jaqaman et al., 2008] pour détecter la fusion de trajectoire. On compare cette méthode à une méthode basée sur des tests statistiques de l'hypothèse de conservation du volume. Enfin, une application à la détection d'événements de fusion de corps lipidiques est présentée.

Détection d'événements de fusion

Les fusions correspondent à des événements de rupture dans lesquels deux objets «disparaissent»et un nouvel objet «apparaît ». Il est donc naturel d'utiliser la fin d'une trajectoire comme élément permettant d'identifier un événement de fusion. Cependant, comme mentionné dans les sections précédentes, il existe de nombreuses causes à la terminaison d'une trajectoire, à savoir la disparition d'un objet par photo-blanchiment, la disparition d'objets du champ d'observation et des erreurs dans la reconstruction des trajectoires ou la détection des objets. L'utilisation de l'hypothèse de conservation du volume peut permettre de choisir entre ces événements et la fusion. Pour cela, on va construire un ensemble d'*événements candidats* à la fusion, associés à la disparition d'une trajectoire, et prendre une décision sur la base de la conservation des volumes.

Pour ce faire, nous allons, à chaque instant et pour chaque trajectoire qui s'arrête, chercher les trajectoires qui sont suffisamment proches et qui auraient donc pu conduire à un événement de fusion. Pour simplifier, nous utilisons la distance bord à bord avec l'approximation sphérique. Pour deux particules i et j de volume V_i et V_j et de position (x_i, y_i, z_i) et (x_j, y_j, z_j), la distance est définie par :

$$\begin{aligned} d(i,j) &= \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} - R_i - R_j \\ R_i &= \sqrt[3]{\frac{3V_i}{4\pi}} \\ R_j &= \sqrt[3]{\frac{3V_j}{4\pi}} \end{aligned} \tag{4.13}$$

Pour construire les événements candidats, on construit l'ensemble des groupes de trois trajectoires T_1, T_2 et T_3 qui vérifient l'une ou l'autre des conditions suivantes :

1. T_1 et T_2 sont deux trajectoires qui s'arrêtent à un temps t et T_3 une trajectoire qui commence à $t + 1$.
2. T_1 est une trajectoire qui s'arrête à un temps t. T_2 est une partie d'une trajectoire considérée jusqu'à t et T_3 est une partie de cette même trajectoire considérée à partir de $t + 1$.

La figure 4.14 schématise ces deux types d'événements.

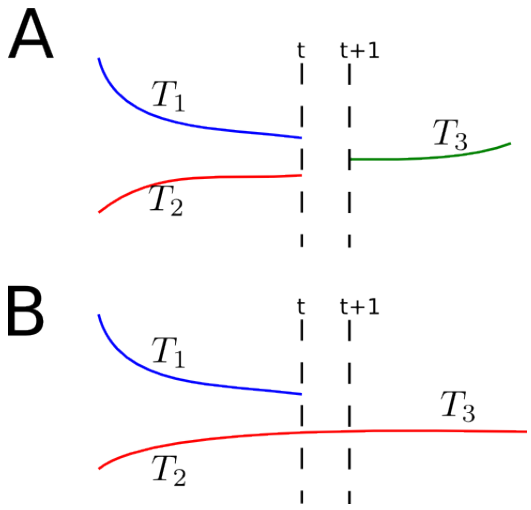


FIGURE 4.14 – A - Événement candidat dans lequel deux trajectoires (bleu et verte) s'arrêtent au temps t et une trajectoire démarre au temps $t+1$ (rouge). Ces trajectoires forment les trajectoires T_1, T_2 et T_3 de l'événement candidat. B - Événement candidat dans lequel une trajectoire (bleu) s'arrête au temps t. La trajectoire bleu correspond à T_1 et les trajectoires T_2 et T_3 sont obtenues en considérant les parties de la trajectoire rouge avant et après l'instant t respectivement.

On peut noter que cette définition est proche de celle donnée dans [Jaqaman et al., 2008] pour les événements de fusion (sans conservation de volume). Dans cet article, la fusion est définie comme un lien entre un objet d'une trajectoire qui se termine à un instant t et un objet appartenant à une seconde trajectoire définie à l'instant $t+1$.

La seconde propriété est nécessaire parce que l'algorithme de construction des trajectoires ne prend pas en compte les événements de fusion et peut associer la trajectoire après l'événement de fusion à l'une des deux trajectoires précédant l'événement de fusion. Cette deuxième propriété implique aussi qu'il n'y a pas correspondance univoque entre les trajectoires des événements candidats et les trajectoires produites par l'algorithme de construction des trajectoires.

L'application sur des données réelles est plus fiable si l'on réduit la recherche aux trajectoires qui comportent au moins 3 points et si l'on élimine les événements pour lesquels la trajectoire 3 n'est pas située suffisamment proche du barycentre des deux trajectoires précédentes (comme c'est le cas lors de la fusion). Cette distance se calcule de la façon suivante :

$$d = \sqrt{\left(\frac{V_1 X_1(t) + V_2 X_2(t))}{V_1 + V_2} - X_3(t+1)\right)^2 + \left(\frac{V_1 Y_1(t) + V_2 Y_2(t))}{V_1 + V_2} - Y_3(t+1)\right)^2 + \left(\frac{V_1 Z_1(t) + V_2 Z_2(t))}{V_1 + V_2} - Z_3(t+1)\right)^2} \quad (4.14)$$

Un objet d'une trajectoire i est identifié par son volume V_i, sa position (X_i, Y_i, Z_i) et l'instant t auquel il a été observé. On peut choisir le seuil à partir de la distribution des déplacements après correction de la dérive, figure 4.10. Un seuil de $0.3\mu m$ a été retenu pour tenir compte du déplacement (potentiel) des objets entre deux instants.

4.4.1 Méthode statistique pour détecter des événements de fusion

On suppose que les mesures de volume sont sujettes à un bruit provenant de la combinaison de facteurs comme la fluorescence, la technique d'imagerie et la procédure de détection. Nous avons vu que la variance du bruit sur les volumes était stabilisée par l'application d'une transformation racine carrée du volume. Dans la suite, on utilise les notations suivantes pour $x \in \ ^+$:

$$\begin{aligned} f &: x \mapsto x^2 \\ f^{-1} &: x \mapsto \sqrt{x} \end{aligned} \tag{4.15}$$

On estime la variance σ^2 sur la mesure des volumes à partir d'un modèle basé sur les trajectoires et non pas sur les événements candidats car deux événements candidats différents peuvent faire intervenir la même trajectoire. On suppose donc le modèle de trajectoire suivant :

$$Y_{jk} = f^{-1}(V_{jk}) = \nu_k + \sigma^2 \varepsilon_{jk} \tag{4.16}$$

Les ε_{jk} sont des variables aléatoires indépendantes, gaussiennes centrées et réduites, V_{jk}, la $j^{ème}$ mesure de volume de la trajectoire k et $f(\nu_k)$, le volume de la particule k. L'estimateur de la variance utilisé est donné par :

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1}^{K} \sum_{j=1}^{J_k} (Y_{jk} - \bar{Y}_k)^2 \tag{4.17}$$

Où N représente le nombre d'observations, K le nombre de trajectoires, J_k le nombre d'observations pour la trajectoire k et $\bar{Y}_k$ la moyenne empirique des observations de la trajectoire k. On a, asymptotiquement, le résultat suivant :

$$\frac{\hat{\sigma}^2}{\sigma} \sim \chi^2_d \tag{4.18}$$

Où d est défini par :

$$d = N - K \tag{4.19}$$

On va maintenant s'intéresser aux événements candidats afin de mettre en place un test de l'hypothèse de conservation du volume au cours de l'événement candidat de fusion. On propose donc le modèle statistique suivant pour les mesures de volume des événements candidats :

$$f^{-1}(V_{ijk}) = Y_{ijk} = \mu_{jk} + \sigma^2 \varepsilon_{ijk} \tag{4.20}$$

La variable aléatoire Y_{ijk} correspond à la ième mesure de la trajectoire j ($\in 1, 2, 3$) de l'événement candidat k ($\in 1, \cdots, M$). Les variables aléatoires ε_{ijk} sont indépendantes, gaussiennes centrées réduites et σ^2 représente la variance. On note n_{jk} le nombre d'observation pour la trajectoire j de l'événement k. Elles modélisent un bruit de mesure.

Nous allons maintenant mettre en place un test de l'hypothèse de conservation du volume. Par commodité de notation, on présente le test pour un événement candidat. Avec les notations précédentes, l'hypothèse de conservation du volume s'écrit :

$$\Psi = \Psi(\mu) = f(\mu_3) - f(\mu_2) - f(\mu_1) = 0 \tag{4.21}$$

Avec $\mu = (\mu_1, \quad \mu_2, \quad \mu_3)$. On va estimer cette quantité à partir des moyennes empiriques $\hat{\mu}_i = \sum_{j=1}^{n_i} Y_j$:

$$\hat{\Psi} = \Psi(\hat{\mu}) = f(\hat{\mu}_3) - f(\hat{\mu}_2) - f(\hat{\mu}_1) \tag{4.22}$$

On va tester l'hypothèse de conservation du volume (H_0) contre la non conservation du volume (H_1).

$$(H_0) \;\; \Psi(\mu) = 0$$
$$(H_1) \;\; \Psi(\mu) \neq 0$$

Pour obtenir les propriétés de l'estimateur $\hat{\Psi}$. Un développement de Taylor à l'ordre 1 autour de $E[\hat{\mu}] = \mu$ donne :

$$\hat{\Psi} \simeq \Psi + \left[\frac{\partial \Psi}{\partial \mu}(\mu)\right](\hat{\mu} - \mu)^T \tag{4.23}$$

avec :

$$\frac{\partial \Psi}{\partial \mu}(\mu) = (-f'(\mu_1), \quad -f'(\mu_2), \quad f'(\mu_3)) \tag{4.24}$$

Comme f' est continue sur $^+$ et $\hat{\mu} \longrightarrow \mu$ lorsque le nombre d'observations augmente, on a donc bien un estimateur consistent de Ψ. On note $\sigma^2\xi^2$ la variance de cet estimateur. Celle-ci s'écrit :

$$\begin{aligned} Var(\hat{\Psi} - \Psi) &= Var\left(\left[\frac{\partial \Psi}{\partial \mu}(\mu)\right](\hat{\mu} - \mu)^T\right) \\ &= Var\left(-f'(\mu_1)(\hat{\mu}_1 - \mu_1) - f'(\mu_2)(\hat{\mu}_2 - \mu_2) + f'(\mu_3)(\hat{\mu}_3 - \mu_3)\right) \\ &= \sigma^2 \sum_{j=1}^{3} \frac{(f'(\mu_j))^2}{n_j} \\ &:= \sigma^2\xi^2 \end{aligned}$$

Et comme $\hat{\mu} - \mu \sim \mathcal{N}_3(0, \sigma^2 I_3(n))$, avec $I_3(n) = \begin{pmatrix} \frac{1}{n_1} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{n_2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{n_3} \end{pmatrix}$, on obtient le résultat suivant :

$$S = \frac{\hat{\Psi} - \Psi}{\sigma\xi} \sim \mathcal{N}(0, 1) \tag{4.25}$$

En utilisant l'estimateur de la variance (4.17) et un estimateur basé sur les moyennes empiriques pour $\sigma^2\xi^2$, on définit :

$$\hat{S} = \frac{\hat{\Psi} - \Psi}{\hat{\sigma}\hat{\xi}} \tag{4.26}$$

Il est clair que $\hat{\xi} \longrightarrow \xi$ quand $n \longrightarrow \infty$. En utilisant le fait que $\frac{X}{\sqrt{\frac{Y}{d}}} \sim \mathcal{T}_d$ si $X \sim \mathcal{N}(0, 1)$ et $Y \sim \chi^2_d$ avec X et Y indépendants, on a sous H_0 :

$$\hat{T} = \frac{\hat{\Psi}}{\hat{\sigma}\hat{\xi}} \simeq \mathcal{T}_d \tag{4.27}$$

On peut ainsi définir la p-value associée au test par :

$$R = \left\{ \hat{p} = P(|Z| > |\hat{T}|, Z \sim \mathcal{T}_d) \right\} \tag{4.28}$$

On définit alors la zone de rejet de l'hypothèse nulle en utilisant une correction de Bonferroni afin d'obtenir un niveau α sur l'ensemble des tests sur les événements candidats :

$$\hat{p}_k \leq \frac{\alpha}{M} \tag{4.29}$$

Afin d'éviter la sur-détection d'événement de fusion, on propose d'utiliser un second test qui permet de garantir que le volume a effectivement changé après l'événement de fusion. On est donc amené à considérer la variation de volume entre la trajectoire 1 et la trajectoire 3 et entre la trajectoire 2 et la trajectoire 3. Le changement de volume s'écrit (pour $i = 1, 2$) :

$$\Gamma_i(\mu) = \mu_i - \mu_3 = Q_i \mu \neq 0 \tag{4.30}$$

Où $Q_1 = (1\ 0\ -1)$ et $Q_2 = (0\ 1\ -1)$. On teste alors

$$(H_0)\ \ \Gamma_i(\mu) = 0$$
$$(H_1)\ \ \Gamma_i(\mu) \neq 0$$

Comme $\hat{\mu} - \mu \sim \mathcal{N}_3(0, \sigma^2 I_3(n))$, on en déduit :

$$\frac{Q_1(\hat{\mu} - \mu)}{\sigma \sqrt{Q_i I_3(n) {Q_i}^T}} \sim \mathcal{N}(0, 1) \tag{4.31}$$

En procédant comme précédemment, on trouve sous H_0 que :

$$\hat{U}_i = \frac{Q_i \hat{\mu}}{\hat{\sigma} \sqrt{Q_i I_3(n) {Q_i}^T}} \sim \mathcal{T}_d \tag{4.32}$$

On définit donc les p-values suivantes :

$$\begin{aligned} \hat{q}_1 &= P\left(|Z| > |\hat{U}_1|, Z \sim \mathcal{T}_d\right) \\ \hat{q}_2 &= P\left(|Z| > |\hat{U}_2|, Z \sim \mathcal{T}_d\right) \end{aligned} \tag{4.33}$$

Avec ces deux nouveaux tests, la région de rejet de l'événement de fusion devient :

$$R = \left\{ \hat{p}_k \leq \frac{\alpha}{M}, \quad \hat{q}_{1k} > \frac{\alpha}{M}, \quad \hat{q}_{2k} > \frac{\alpha}{M} \right\}$$

4.4.2 Méthode heuristique pour détecter les fusions

Dans cette section, on propose une alternative à la méthode précédente en adaptant une règle de décision basée sur l'article de [Jaqaman et al., 2008]. Cette méthode peut s'écrire dans le cadre d'un problème d'affectation linéaire et est basée sur des coûts associés aux événements de fusion et de non fusion. Elle nécessite donc la spécification de seuils pour chaque événement.

La fonction de coût pour l'événement de fusion est définie par :

$$\begin{aligned} C_{12} &= \begin{cases} |1 - \rho_{12}|, & \rho_{12} > 1 \\ |1 - \rho_{12}^{-2}|, & \rho_{12} < 1 \end{cases} \\ \rho_{12} &= V(3)/(V(1) + V(2)) \end{aligned} \tag{4.34}$$

Plus cette fonction est proche de 0, plus l'événement est considéré comme probable. De façon analogue au deuxième test de la section précédente, on définit les coûts suivants :

$$\begin{aligned} C_1 &= \begin{cases} |1-\rho_1|, & \rho_1 > 1 \\ |1-\rho_1^{-2}|, & \rho_1 < 1 \end{cases} \\ \rho_1 &= V(3)/V(1) \end{aligned} \tag{4.35}$$

et :

$$\begin{aligned} C_2 &= \begin{cases} |1-\rho_2|, & \rho_2 > 1 \\ |1-\rho_2^{-2}|, & \rho_2 < 1 \end{cases} \\ \rho_2 &= V(3)/V(2) \end{aligned} \tag{4.36}$$

Comme un événement candidat peut ne correspondre à aucun événement, il est nécessaire de définir des seuils au delà desquels on considère que l'événement n'a pas lieu. Ces coûts sont assez difficiles à déterminer et il est bon de déterminer des seuils acceptables à partir de données simulées.

Pour la comparaison avec la méthode précédente, on définit des seuils «optimaux », qui permettront d'obtenir les meilleures performances possibles sur des données simulées, selon un protocole décrit en détail dans la suite. On simule un ensemble d'événements A, dont une sous-partie B correspond à des événements de fusion et on définit les seuils τ_1 et τ_2 de la façon suivante :

$$\tau_1 = \max_{\substack{e \in B, \\ C_{12}<C_1 \text{ et } C_{12}<C_2}} \{C_1, C_2\} \tag{4.37}$$

$$\tau_2 = \min_{\substack{e \in A \setminus B, \\ C_{12}<C_1 \text{ et } C_{12}<C_2}} \{C_1, C_2\} \tag{4.38}$$

Le seuil τ_1 correspond donc au coût de fusion le plus élevé parmi les événements de fusion et le seuil τ_2 correspond au coût de fusion le moins élevé pour les événements qui ne sont pas des fusions.

La première règle de décision utilise simplement les volumes et est considérée simplement pour référence. On considère que l'événement de fusion a lieu si le coût associé à la fusion est plus petit que les deux autres coûts :

$$D_1 : \begin{cases} C_{12} < C_1 \\ C_{12} < C_2 \end{cases} \tag{4.39}$$

La deuxième règle de décision fait intervenir un seuil τ_1 qui maximise la capacité de la règle à détecter les événements de fusion. Elle est définie par :

$$D_2 : \begin{cases} C_{12} < C_1 \\ C_{12} < C_2 \\ C_{12} < \tau_1 \end{cases} \tag{4.40}$$

La deuxième règle de décision fait intervenir un seuil τ_2 qui minimise le nombre de faux positifs. Elle est définie par :

$$D_3 : \begin{cases} C_{12} < C_1 \\ C_{12} < C_2 \\ C_{12} < \tau_2 \end{cases} \tag{4.41}$$

En pratique, on ne peut pas définir les seuils τ_1 et τ_2. Ils seront définis à partir de données simulées, sur la base de la vérité terrain, afin de pouvoir comparer avec la méthode précédente. Le seuil qui réalise le meilleur compromis entre les bonnes détections d'événements de fusion et le nombre de faux positifs se situe entre les seuils τ_1 et τ_2.

4.4.3 Comparaison et résultats

Données synthétiques

On génère des événements candidats (300 événements) suivant les trois événements suivants :

— Fusion (40%) : $V_3 = V_1 + V_2$,

— Mauvaise détection (20%) : $V_3 = V_1$,

— Pas d'événement (40%).

Les volumes V_1, V_2 et V_3 (lorsqu'il n'y pas d'événement) sont tirés aléatoirement dans une loi uniforme sur $[4, 30]$. Les observations V_{ijk} pour les trajectoires sont générées à partir du modèle statistique 4.20. Les seuils τ_1 et τ_2, définis par (4.37) et (4.38) sont calculés à partir des données simulées.

On s'intéresse à la comparaison des deux méthodes présentées précédemment dans des cas où l'application de f^{-1} sur les volumes est nécessaire et dans des cas où elle n'est pas nécessaire. On veut aussi comparer les performances lorsque le nombre de données disponibles est faible (100 points par trajectoire) ou très faible ($4 - 10$ par trajectoire).

Comparaison des méthodes

Pour comparer les différentes méthodes présentées, on décompose les résultats en quatre groupes :

— Groupe A : les événements de fusion détectés comme étant des événements de fusion par la méthode.

— Groupe B : les événements détectés à tort comme étant des événements de fusion par la méthode.

— Groupe C : les événements de fusion non détectés par la méthode.

— Groupe D : les événements qui ne sont pas des fusions et qui sont détectés comme n'étant pas des fusions par la méthode.

Le tableau 4.5 présente ces quatre groupes.

	Fusion	Non Fusion
Détecté comme fusion	A	B
Non détecté comme fusion	C	D

TABLE 4.5 – Partition des résultats de la détection des événements.

On compare les méthodes à l'aide des critères suivants :

— Rappel : nombre d'événements de fusion pertinemment détectés sur le nombre d'événements de fusion.

$$Rappel = \frac{A}{A + C} \tag{4.42}$$

— Taux de faux positif : nombre d'événements de fusion non pertinents sur le nombre d'événements de fusion détectés.

$$\text{Taux de faux positifs} = \frac{B}{A + B} \tag{4.43}$$

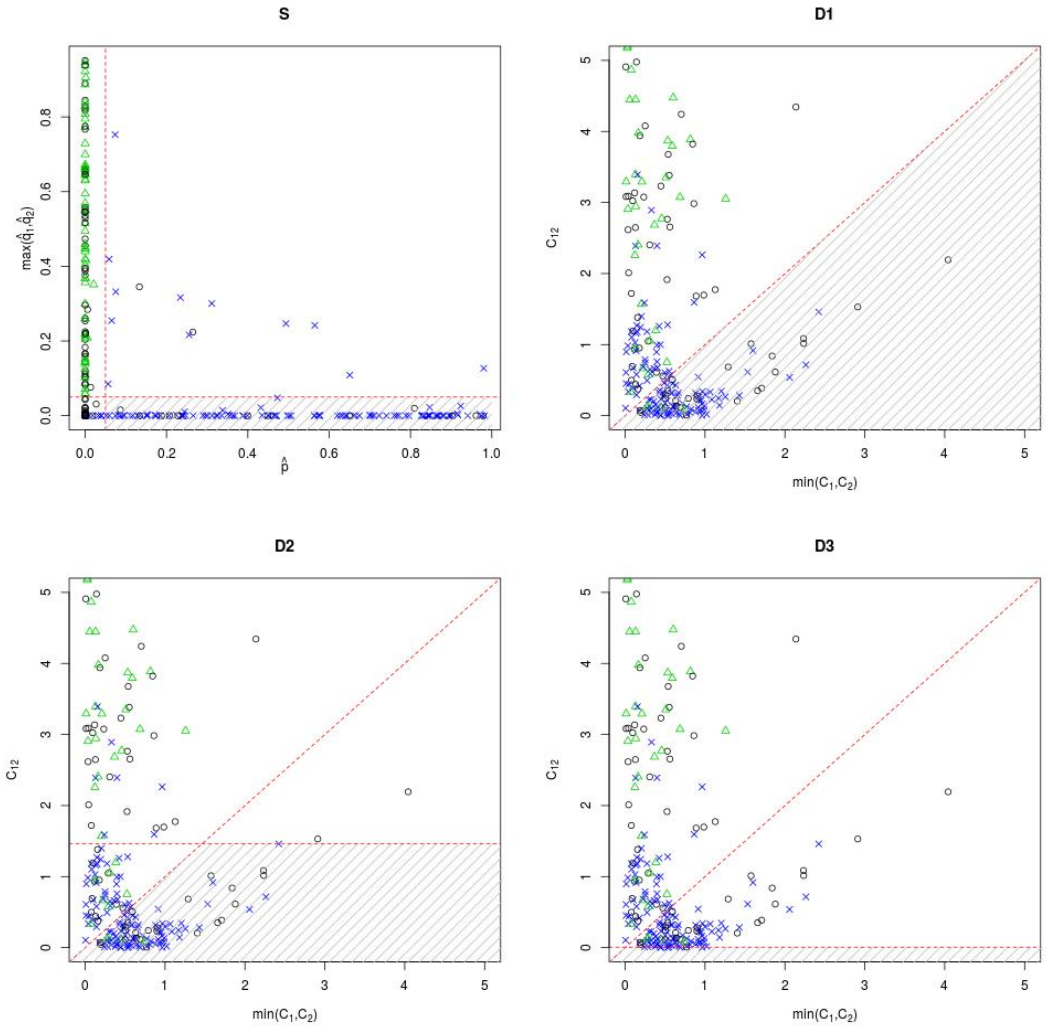


FIGURE 4.15 – Régions d'acceptation pour les règles de décision (S), (D1), (D2) et (D3). Les événements de fusion sont représentés par des croix bleues, les mauvaise détections par des triangles verts et les autres événements par des ronds noirs. Les zones hachurées représentent les régions d'acceptation de chaque méthode.

— F-score : permet de synthétiser la qualité de la méthode en général. Le *F-score* est défini par :

$$F_{score} = \frac{2A}{2A + B + C} \tag{4.44}$$

Lorsque ce score est proche de 1, on considère que la méthode est performante.

Le niveau des tests est fixé à 5%.

On compare les méthodes basées sur les règles de décision (4.4.1), (4.39), (4.40) et (4.41), que l'on appelle respectivement (S), (D1), (D2) et (D3). La figure 4.15 présente les régions d'acceptation des différentes méthodes. Les tableaux 4.6, 4.7 et 4.8 présentent les valeurs de rappel et taux de faux positifs dans les différents scénarios.

Le tableau 4.6 montre que, dans le cas avec peu de données et quand la variance est la même quel que soit le volume, la méthode basée sur les tests statistiques (S), a un moins bon rappel mais un meilleur taux de faux positifs. La même tendance est visible sur le

tableau 4.7 pour le scénario avec une variance dépendante du volume. On constate cependant que les performances globales sont largement impactées dans ce scénario pour toutes les méthodes. On constate aussi que la variance impacte fortement les performances de toutes les méthodes.

Lorsque que plus de données sont disponibles par trajectoires, on constate, comme l'indique le tableau 4.8, que les performances sont bien meilleures pour la méthode basée sur les tests statistiques et que l'impact de la variance est beaucoup moins important que pour les autres méthodes.

σ^2	S		D1		D2		D3	
Small	93	2	99	13	99	9	39	0
Medium	95	4	97	16	97	10	28	0
Large	90	7	93	23	93	16	5	0

TABLE 4.6 – Rappel (gauche) et taux de faux positifs (droite) dans le scénario avec peu de points par trajectoires et une variance indépendante du volume. Les résultats sont présentés en pourcentages.

σ^2	S		D1		D2		D3	
Small	78	14	75	26	75	24	3	0
Medium	58	9	59	31	59	31	1	0
Large	34	10	53	45	53	45	1	0

TABLE 4.7 – Rappel (droite) et taux de faux positifs (gauche) dans le scénario avec peu de points par trajectoires et une variance dépendante du volume. Les résultats sont présentés en pourcentages.

σ^2	S		D1		D2		D3	
Small	96	4	69	24	69	21	2	0
Medium	96	2	56	28	56	28	1	0
Large	92	10	47	42	47	42	1	0

TABLE 4.8 – Rappel (droite) et taux de faux positifs (gauche) dans le scénario avec un grand nombre de points par trajectoires et une variance dépendante du volume. Les résultats sont présentés en pourcentages.

La figure 4.16 donne les *F-score* en fonction de la variance et du nombre de points dans le cas où la variance est la même quel que soit le volume et lorsqu'elle dépend du volume pour la méthode basée sur les tests statistiques (S) et la méthode heuristique (D1). On constate que la méthode (S) a de meilleures performances, particulièrement lorsque le nombre de points par trajectoire est grand. De plus, l'application de la transformation qui stabilise la variance améliore les performances de la méthode (S).

En conclusion, la méthode (S) basée sur les tests statistiques a de meilleures performances générales et est plus robuste que les méthodes heuristiques. En effet, l'utilisation

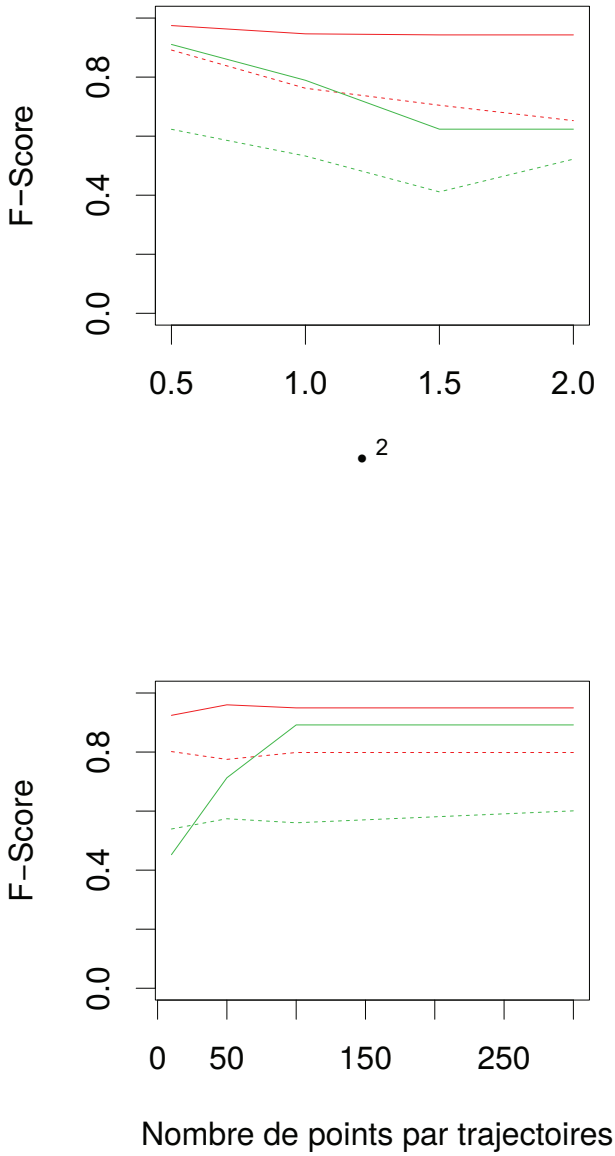


FIGURE 4.16 – *F-score* en fonction de la variance et du nombre de points par trajectoire. Les traits pleins représentent le *F-score* pour la méthode (S) et les traits pointillés pour la méthode (D1). Les traits verts correspondent au scénario avec variance dépendant du volume et les traits rouges correspondent au scénario avec variance indépendante du volume.

Génotype	Nombre de fusions	Nombre de fusions détectables	Nombre de fusions détectées	Nombre de fusions proposées	Nombre d'événements possibles
col0	10	3	3	1.2%	1194
s1	4	0	0	1.5%	197
s3	6	1	1	3%	239
s1s3s4	4	1	1	2%	299

TABLE 4.9 – Récapitulatif des événements de fusion détectés par génotypes.

de la correction de la variance et l'utilisation de plusieurs instants pour prendre la décision permet d'améliorer les performances, en particulier lorsque beaucoup de points sont disponibles. De plus, elle ne nécessite pas la définition de seuils mais simplement d'un niveau pour les tests. Le choix du niveau peut être adapté en fonction des besoins de l'utilisateur et confère donc à cette méthode plus de flexibilité.

Application aux données de corps lipidiques

L'application de la méthode basée sur des tests statistiques sur les données de corps lipidiques permet de détecter correctement un certain nombre d'événements de fusion mais conduit à un certain nombre de faux positifs. Cette section présente les résultats obtenus lors de l'application de la procédure complète de la détection des corps lipidiques à la prise de décision. Le tableau 4.9 récapitule les résultats obtenus pour différents génotypes.

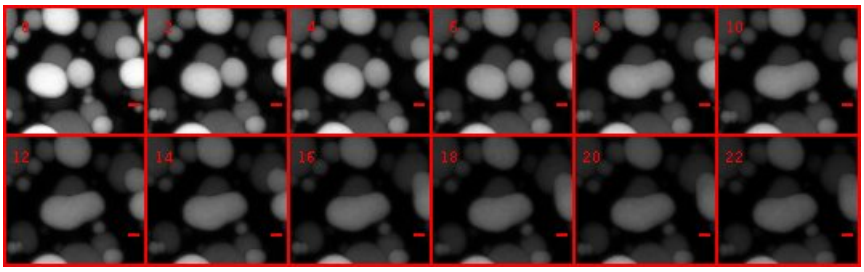


FIGURE 4.17 – Événement de fusion dans une séquence d'images pour le mutant s1s3s4. Les images présentent la somme de quelques sections autour de l'événement. La barre rouge correspond à $1,2\mu m$ et les instants sont indiqués en haut à gauche des images.

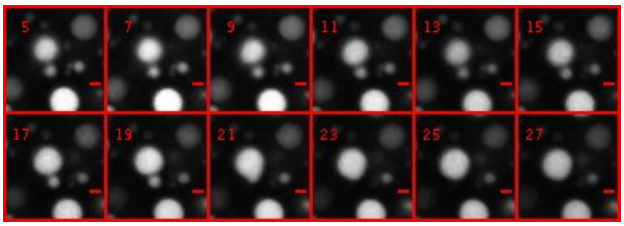


FIGURE 4.18 – Événement de fusion dans une séquence d'images pour le mutant s1s3s4. Les images présentent la somme de quelques sections autour de l'événement. La barre rouge correspond à $1,2\mu m$ et les instants sont indiqués en haut à gauche des images.

Génotype	Index	T	V1	V2	Détectable
Col0	1	21	2.1	41.6	N
	2	15	8.2	28.7	N
	3	15	4.2	4.2	O
	4	26	20.6	14.1	N
	5	18	5.6	5.6	N
	6	15	2.1	20.6	O
	7	17	33.5	4.2	N
	8	16	33.5	0.9	N
	9	23	28.7	28.7	O
	10	8	73.6	0.5	N
s1	1	10	102.1	9.1	N
	2	11	41.6	1.4	N
	3	9	12.0	1.4	N
	4	16	12.2	3	N
s3	1	2	5.6	1.4	N
	2	8	-	-	N
	3	13	11.5	20.1	N
	4	19	-	-	N
	5	5	11.5	38.8	N
	6	6	8.7	5.5	O
s1s3s4	1	8	88.4	17.1	O
	2	16	33.5	24.4	N
	3	31	-	-	N
	4	3	0.26	1.43	N

TABLE 4.10 – Détail des événements de fusion détectés. Pour les événements non détectables, les volumes sont calculés à partir du rayon projeté lorsque c'est possible. Les "-" indiquent des volumes qui n'ont pas pu être mesurés car trop partiellement observés.

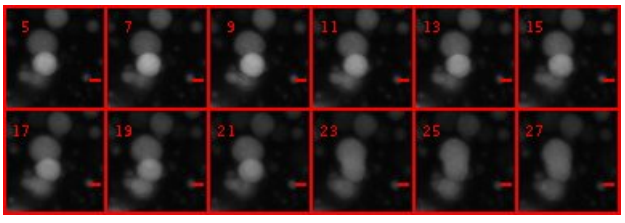


FIGURE 4.19 – Événement de fusion dans une séquence d'images pour le mutant s1s3s4. Les images présentent la somme de quelques sections autour de l'événement. La barre rouge correspond à $1,2\mu m$ et les instants sont indiqués en haut à gauche des images.

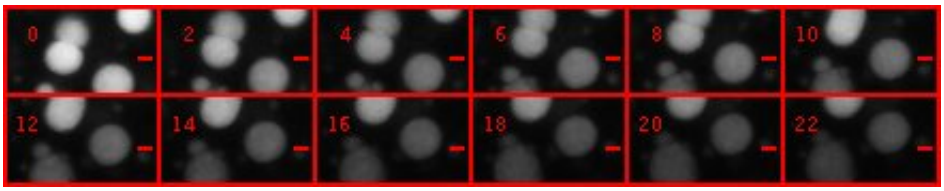


FIGURE 4.20 – Événement de fusion dans une séquence d'images pour le mutant s3. Les images présentent la somme de quelques sections autour de l'événement. La barre rouge correspond à $12\mu m$ et les instants sont indiqués en haut à gauche des images. Cet événement de fusion a lieu sur un bord de la zone d'observation.

On peut observer en premier lieu que quelques événements de fusion ont pu être observés sur chacun des jeux de données. Le tableau, 4.10 présente avec plus de détails ces événements de fusion. Les figures 4.17, 4.18, 4.19 et 4.20 présentent les séquences d'images pour quelques événements de fusion. On constate notamment que la fusion peut avoir lieu entre objets de tailles très différentes. On a pu observer des différences de plusieurs ordres de grandeurs entre les volumes de deux objets qui fusionnent. On peut aussi remarquer qu'un certain nombre d'événements ne peuvent pas être détectés par la procédure mise en place car les objets impliqués sont situés proches des bords du champ d'observation et sont donc partiellement observés. Les mesures des caractéristiques de l'objet, en particulier le volume, sont généralement fortement impactées et il est préférable de ne pas considérer ces objets dans la procédure de détection.

Il faut noter que l'application de la procédure de détection conduit à un certain nombre de mauvaises détections. Ces erreurs sont liées généralement à une mauvaise détection des objets ou de la mesure du volume (liée à la perte de fluorescence). Il est possible qu'une partie de ces erreurs soit imputable à la procédure de construction des trajectoires qui peut manquer de robustesse dans des environnements relativement encombrés.

Cependant, la procédure de détection permet de réduire considérablement les recherches d'événements de fusion puisqu'elle permet de restreindre les recherches jusqu'à 1.2% des événements candidats. Il est par la suite aisé pour un utilisateur averti de faire le tri parmi les événements sélectionnés par la procédure de détection. Il est important de noter que la recherche manuelle d'événements n'a pas permis de trouver des événements de fusion qui n'auraient pas été détectés par la procédure de détection. On a constaté que le temps exact de l'événement de fusion peut être mal détecté. Ceci s'explique par le rapprochement des deux objets et la difficulté qui s'ensuit à détecter correctement la frontière entre les deux objets.

Enfin, compte tenu du nombre relativement faible d'événements détectés pour chaque jeu de données, il parait impossible de conclure sur la proportion de fusion en fonction du génotype. Il est possible que certains temps d'observation soient plus propices aux événements de fusion.

Chapitre 5

Modélisation de la dynamique des corps lipidiques

Contents

5.1 Donnés d'imagerie de corps lipidiques 101
5.2 Modèles de dynamiques des corps lipidiques 101
5.2.1 Modèles à base d'agents 104
5.2.2 Modèles d'interfaces 106
5.2.3 Modèle de champ moyen 107
Modèle de Lifschitz, Slyosov et Wagner 107
Équation de coalescence de Smoluchowski 107
5.2.4 Proposition de modèle 109
5.3 Estimation de paramètres dans un modèle de coalescence . . 112
5.3.1 Problème d'estimation de paramètres 112
Modèle statistique 114
Maximum de vraisemblance 114
Méthode des moments 115
Méthode des moments généralisés 116
Autres méthodes 117
5.3.2 Estimation du taux de fusion 117
Estimateur des moments généralisés 118
Résultats de simulation 119
5.3.3 Comparaison de populations 119
Hypothèses de modélisation 121
Test de comparaison des taux de fusion 121
5.3.4 Résultats 121
Estimation des taux de fusion 121
Comparaison des taux de fusion 122
Hypothèse 1 - Effet des mutations 122
Hypothèse 2 - Effet des doubles et triple mutations . . . 124
Hypothèse 3 - Effet de l'abondance des oléosines 124
5.4 Discussion 125

Ce chapitre présente un modèle de l'évolution de population de corps lipidique de jeunes embryons d'*A. thaliana* et l'estimation de paramètres à partir de mesures de volumes de corps lipidiques extraites d'images de microscopie confocale. Un rapide état de l'art des modèles utilisés pour modéliser l'évolution des corps lipidiques précède la présentation d'un modèle adapté au cas des corps lipidiques d'embryons d'*A. thaliana*. Ce modèle repose sur une équation modélisant la fusion de gouttes deux à deux. Dans une seconde partie, un estimateur du taux de fusion est proposé. Cet estimateur est ensuite utilisé pour comparer les taux de fusion pour différents génotypes.

5.1 Donnés d'imagerie de corps lipidiques

Le jeu de données utilisé dans la suite est obtenu à partir d'embryons d'*A. thaliana* selon le protocole [Miquel et al., 2015] et est similaire à celui décrit dans la partie 4. Ce jeu de données a été acquis dans le cadre de la thèse de G. Trigui [Trigui, 2014] et a été utilisé dans [Miquel et al., 2014, Trigui et al., 2012] dans le cadre de travaux d'analyse de données et de modélisation.
Les données correspondent à des mesures de volumes de corps lipidiques à partir d'images d'embryons observés de 6 à 10 jours après la floraison. L'observation étant destructrice, il n'est pas possible de suivre un même embryon au cours du temps. Le type sauvage *col0* exprime toutes les oléosines. Les mutants n'expriment pas les oléosines indiquées par leur nom. Par exemple le mutant *s3* n'exprime pas l'oléosine *s3*. Le tableau 5.1 présente les données et quelques statistiques pour les génotypes disponibles. Pour chaque génotype et pour chaque jour, les mesures de volumes de corps lipidiques de trois embryons ont été utilisés. Certaines valeurs de volumes aberrantes ont été retirées.

La figure 5.1 présente l'évolution des quartiles et de la moyenne pour chaque génotype. On constate notamment que la moyenne augmente au cours du temps. On constate aussi que les distributions sont très asymétriques puisque la moyenne est assez éloignée de la médiane. Ceci indique un faible nombre de très gros objets et un nombre plus important d'objets plus petits. On note que les mutants ont des moyennes proches ou supérieures à celles du type sauvage *col0*. La figure 5.2 indique que les supports de distributions varient au cours du temps. On constate en effet une proportion plus importante de *gros* corps lipidiques au jour 10. On remarque aussi que les mutants, en particulier le triple mutant *s1s3s4*, ont des supports plus grands que le type sauvage.
Ce jeu de données est utilisé dans la suite pour estimer les paramètres d'un modèle d'évolution des distributions de volume.

5.2 Modèles de dynamiques des corps lipidiques

Les corps lipidiques ont un rôle central dans la régulation du flux métabolique de la cellule. Ils sont donc des organelles dynamiques qui évoluent en fonction des besoins de la cellule. En cas, d'excès d'acides gras, la cellule va produire des lipides neutres qui seront stockés dans les corps lipidiques. En revanche, en cas de manque d'acides gras, la cellule

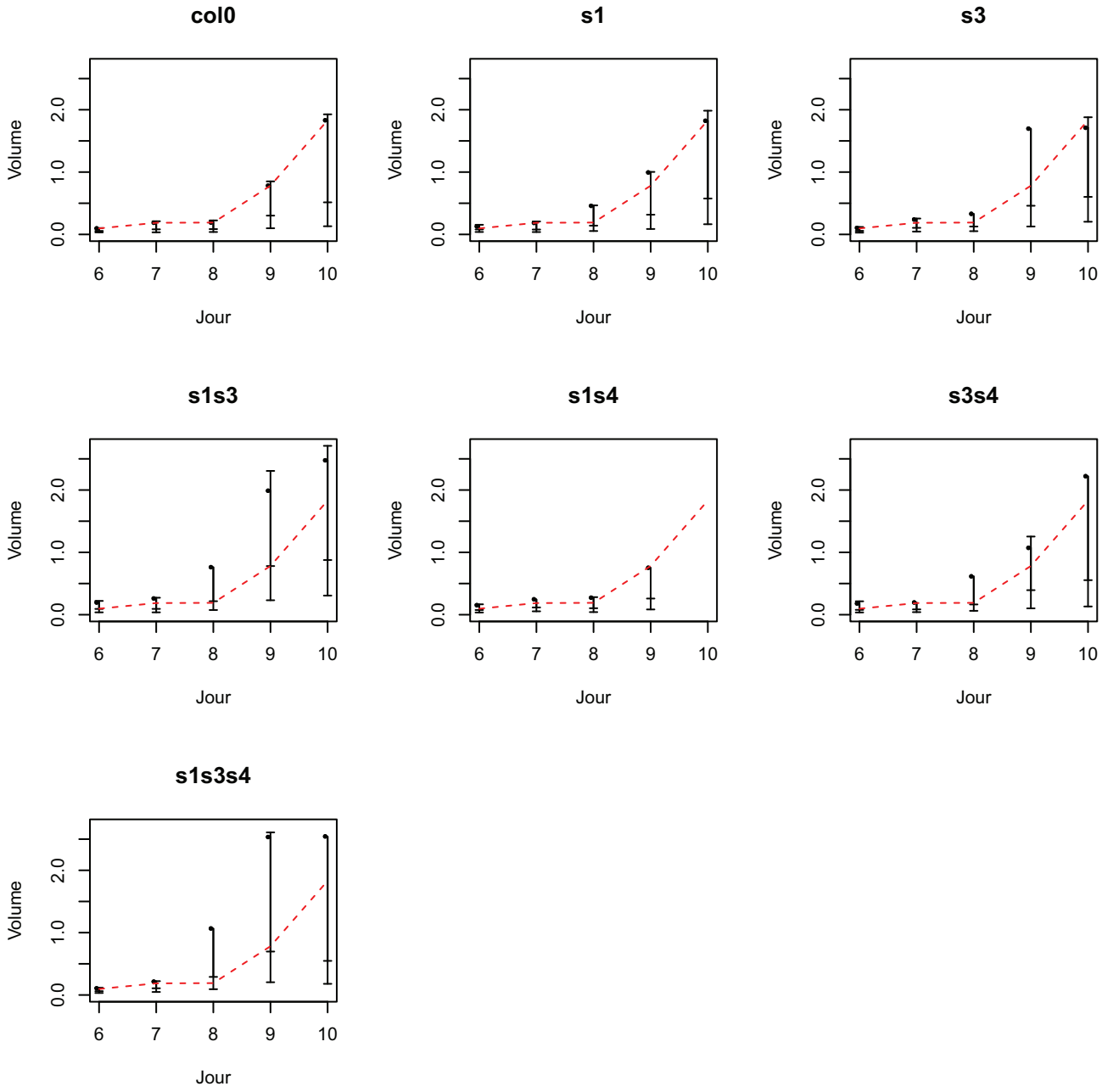


FIGURE 5.1 – Moyennes (point noir) et quartiles (traits horizontaux) des distributions de volumes (μm^3) de corps lipidiques à chaque instant pour tous les génotypes. La ligne en pointillée rouge représente la moyenne du type sauvage col0.

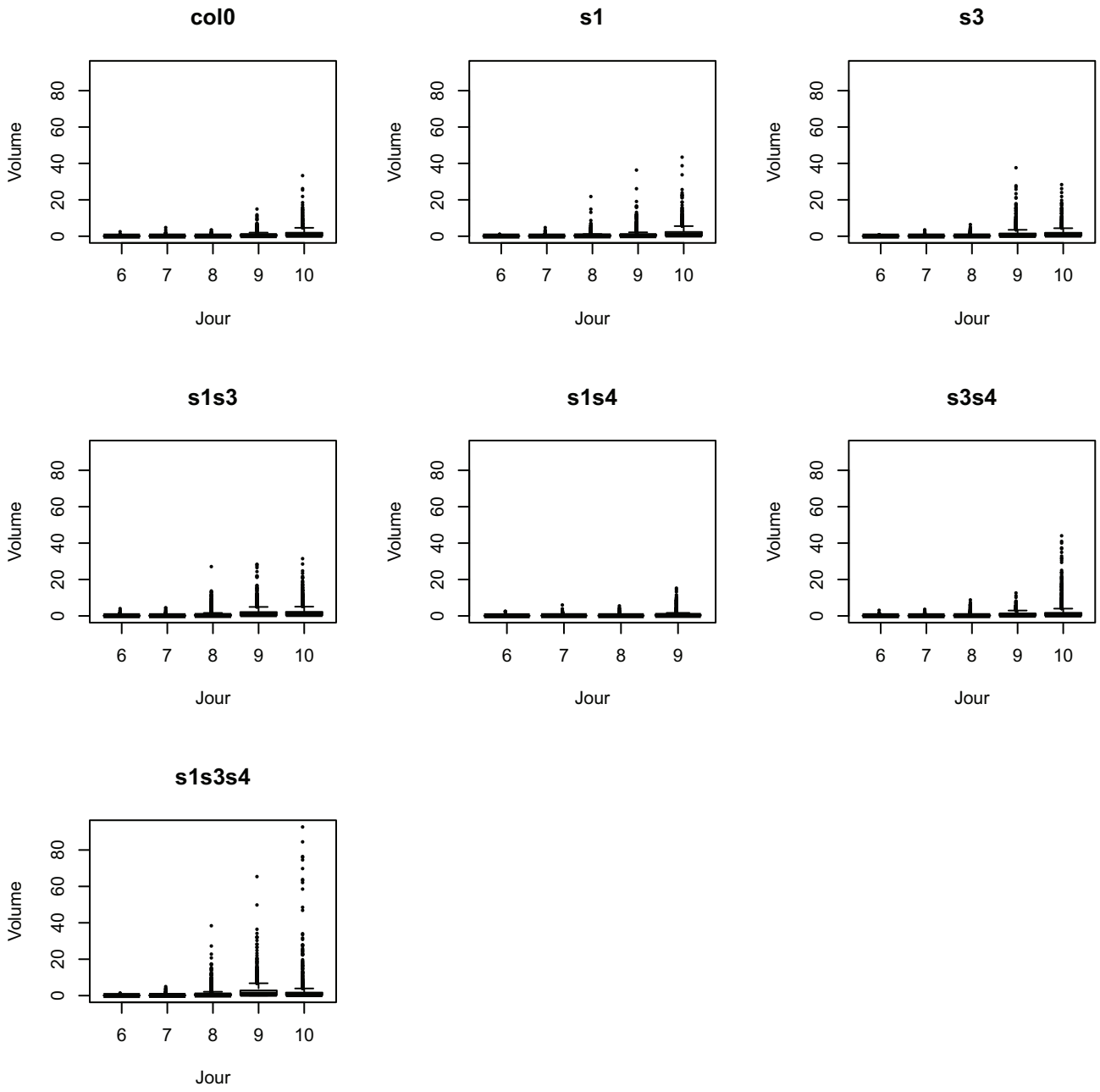


FIGURE 5.2 – Distributions des volumes (μm^3) à chaque instant pour tous les génotypes.

		col0	s1	s3	s1s3	s1s4	s3s4	s1s3s4
	N	807	272	542	1570	484	582	343
Jour 6	Moyenne	0.10	0.13	0.10	0.19	0.15	0.18	0.09
	Écart type	0.15	0.15	0.12	0.30	0.25	0.27	0.13
	N	952	1136	789	585	1052	836	1138
Jour 7	Moyenne	0.19	0.18	0.20	0.26	0.25	0.20	0.21
	Écart type	0.31	0.31	0.33	0.45	0.43	0.35	0.38
	7	907	1634	1766	3015	1721	1541	1886
Jour 8	Moyenne	0.20	0.51	0.31	0.76	0.27	0.44	1.07
	Écart type	0.31	1.09	0.53	1.53	0.47	0.88	2.36
	N	1048	2117	2264	2061	1837	613	1385
Jour 9	Moyenne	0.78	0.94	1.33	1.79	0.75	1.07	2.50
	Écart type	1.35	1.99	2.54	2.86	1.46	1.64	4.71
	N	587	1070	1011	1474	-	1593	1229
Jour 10	Moyenne	1.83	2.11	1.71	2.05	-	2.04	2.54
	Écart type	3.53	3.83	3.04	3.29	-	4.47	7.78

TABLE 5.1 – Récapitulatif des données disponibles. N correspond au nombre de corps lipidiques détectés.

va mobiliser les ressources contenues dans les corps lipidiques.
Le stockage des lipides neutres peut avoir lieu, a priori, de nombreuses manières. Les processus qui peuvent affecter le stockage des lipides neutres sont les suivants :

— Création *de novo*,

— Fission,

— Fusion,

— Accroissement,

— Mobilisation des lipides par lipolyse,

— Mobilisation par autophagie.

Plusieurs modèles tenant compte de ces mécanismes ont été proposés afin d'expliquer les observations [Trigui, 2014, Boschi et al., 2017]. Cette section présente les différents types de modèles qui peuvent être utilisés pour décrire la dynamique des corps lipidiques et propose un modèle adapté pour décrire cette dynamique chez les jeunes embryons d'*A. thaliana*.

5.2.1 Modèles à base d'agents

Les modèles à base d'agents sont basés sur la description d'un système à travers la spécification d'un environnement, c'est à dire de ses attributs et de ses lois, et d'agents, avec leurs attributs et leurs lois, interagissant dans cet environnement. La description du système se fait à l'échelle de l'agent, c'est à dire à une échelle élémentaire inférieure à l'échelle du système considéré. L'objectif de la modélisation par agent est de décrire un système à l'aide d'un formalisme centré sur l'agent et ses interactions et d'analyser les résultats de simulation du modèle pour répondre à une question scientifique.

La simulation de tels modèles repose généralement sur des méthodes itératives dans lesquelles se suivent une étape de sélection d'un instant et d'une action et une étape de

mise à jour de l'état du système. Les modèles spatiaux sont gérés à partir de graphes de relations.

Ce type de modèle présente cependant certains désavantages, liés particulièrement à la combinatoire lorsque de nombreux agents coexistent et à la grande finesse nécessaire dans la spécification des comportement des agents. En effet, dans les cas où le système inclut de nombreux agents, la simulation devient très coûteuse en temps de calcul et en mémoire. De plus, lorsque peu d'information est disponible, ces modèles restent principalement exploratoires et il est difficile de les utiliser pour analyser des données, particulièrement si l'on souhaite comparer plusieurs populations.

Cette technique peut cependant être utilisée afin de comprendre l'influence des différents mécanismes mentionnés plus haut. L'environnement est alors la cellule dans laquelle les corps lipidiques, qui sont les agents, interagissent, c'est à dire fusionnent, fissionnent et grandissent. Il est alors nécessaire de spécifier les lois des agents et de l'environnement, c'est à dire les lois régissant la fusion, fission, croissance, création et disparition.

L'application de tels modèles par [Boschi et al., 2017], pour des tissus adipeux chez les mammifères, indique que l'évolution des distributions de taille des corps lipidiques peut être expliquée par un taux de fusion très important mais que les autres processus sont nécessaires pour expliquer correctement les observations. Le type de cellule étudié est assez différent des cellules d'embryon de plantes. De plus, leur étude suppose que la fusion peut intervenir seulement entre des corps lipidiques de taille comparable. Dans le cas des jeunes embryons d'*A. thaliana*, on a observé des événements de fusion entre corps lipidiques de taille très différente. De plus, aucun événement de fission n'a été observé dans les graines à ce stade, ce qui est probablement lié à l'absence de mobilisation.

Ce type de modèle est aussi utilisé pour étudier les mécanismes responsables de la fluctuation dans le nombre d'organelles (appareil de Golgi, vacuoles, peroxisome), [Mukherji and O'Shea, 2014]. En effet, de façon similaire à l'étude de l'activation des gènes [Paulsson, 2005], la possibilité de calculer explicitement les moments de l'équation maîtresse permet de quantifier l'influence relative des différents processus. Cette étude considère les processus ayant un impact sur le nombre d'organelles n présents dans la cellule. Les processus considérés sont la création *de novo* d'organelles, avec un taux de production $k_{de\ novo}$ constant, la fusion et fission d'organelles, avec des taux de fusion k_{fusion} par organelles au carré et de fission $k_{fission}$ par organelle et la disparition d'organelles, avec un taux γ par organelle. On peut synthétiser ces processus ainsi :

$$\text{Création } \textit{de novo} \qquad n \xrightarrow{k_{de\ novo}} n+1 \tag{5.1}$$

$$\text{Fusion} \qquad n \xrightarrow{k_{fusion} n(n-1)} n-1 \tag{5.2}$$

$$\text{Fission} \qquad n \xrightarrow{k_{fission} n} n+1 \tag{5.3}$$

$$\text{Disparition} \qquad n \xrightarrow{\gamma n} n-1 \tag{5.4}$$

$$\tag{5.5}$$

On peut alors décrire l'évolution de la probabilité $P_n(t)$ d'observer n organelles au temps

t par l'équation maîtresse. Celle-ci s'écrit :

$$\begin{aligned}\frac{dP_n(t)}{dt} =&(k_{de\ novo} + k_{fission}(n-1))P_{n-1}(t) \\ &+ (\gamma + k_{fusion}n)(n+1)P_{n+1}(t) \\ &- (k_{de\ novo} + k_{fission}n + k_{fusion}n(n-1) + \gamma n)P_n(t)\end{aligned} \tag{5.6}$$

Le rapport de la variance de l'abondance d'organelle σ^2 et de l'abondance moyenne $< n >$ s'appelle le facteur de Fano et s'écrit :

$$\frac{\sigma^2}{< n >} = \frac{1}{\frac{k_{fusion}(2<n>-1)+\gamma}{k_{fusion}(<n>-1)+\gamma} - \frac{k_{fission}<n>}{k_{de\ novo}+k_{fission}<n>}} \tag{5.7}$$

On constate que, naturellement, cette quantité diminue lorsque le taux de fusion k_{fusion} augmente et augmente lorsque le rapport des taux de fission et de création *de novo* augmente. Cette technique permet aux auteurs de détecter des changements d'importance entre les mécanismes et de quantifier les distributions d'abondances.

Cette technique ne permet pas de considérer aisément des populations avec corps lipidiques de tailles hétérogènes, pouvant fusionner avec des corps lipidiques de tailles différentes. Pour étudier explicitement des populations avec des tailles hétérogènes, on utilise généralement des modèles de type champs moyen, d'utilisation généralement plus commode, comme ceux présentés dans la section 5.2.3.

5.2.2 Modèles d'interfaces

Le modèle de Cahn-Hilliard ([Elliott and Songmu, 1986]) permet de représenter la séparation d'un mélange de deux composés en domaines contenant principalement l'un ou l'autre des composés. On représente la proportion de l'un des deux composés sur un domaine spatial Ω par une fonction n ($1 - n$ représente alors la proportion de l'autre composé). A partir de l'énergie libre d'un mélange homogène $\Phi(n(x))$ et d'un paramètre σ dépendant de la tension associée à une interface entre les deux phases, on peut calculer l'énergie libre sur le domaine [Lee et al., 2014] :

$$F(n) = \int_\Omega \left[\Phi(n(x)) + \frac{\sigma^2}{2}|\nabla n(x)|^2\right] dx \tag{5.8}$$

Le potentiel chimique local associé s'écrit alors :

$$\mu(n,x) = \Phi'(n(x)) - \sigma^2 \Delta n(x) \tag{5.9}$$

Ce potentiel chimique est constant sur le domaine lorsque le système est à l'équilibre. Le flux de masse est défini par $J = -M\nabla\mu(n,x,t)$, où M représente une constante de mobilité. En substituant dans l'équation de continuité, issu de la conservation de la masse, on obtient l'équation :

$$\frac{\partial n}{\partial t}(x,t) - M\Delta\mu(n,x,t) = 0 \tag{5.10}$$

À laquelle on adjoint les conditions sur la frontière $\partial\Omega$ du domaine ($\frac{\partial .}{\partial N}(x,t)$ représente la dérivée normale extérieure à la frontière du domaine $\partial\Omega$) :

$$\frac{\partial n}{\partial N}(x,t) = 0 \qquad x \in \partial\Omega \tag{5.11}$$

$$\frac{\partial \mu(n,x,t)}{\partial N} = 0 \qquad x \in \partial\Omega \tag{5.12}$$

et une condition initiale définie sur le domaine :

$$n(x,0) = n_0 \qquad x \in \Omega \tag{5.13}$$

Dans ce type de modèle, les deux phases ont tendance à se regrouper pour former des domaines essentiellement composés d'une unique phase et à minimiser les interfaces entre les deux phases. On peut ainsi observer des phénomènes analogues à la coalescence de gouttes. De plus, on peut aussi observer la disparition de petits domaines isolés au profit de domaines plus grands, de façon analogue aux phénomènes de mûrissement d'Ostwald.

Pour étudier les données disponibles, ce type de modèle présente certaines difficultés dans la définition et l'estimation de paramètres. En effet, il se situe à une échelle plus fine que celle des observations et on ne dispose pas de moyen de représenter les gouttes comme des entités explicites. De plus, peu d'informations spatiales sont disponibles sur les images de corps lipidiques. En effet, on observe simplement les corps lipidiques et pas les contours des cellules, ce qui rend difficile l'utilisation d'un modèle spatialement explicite.

5.2.3 Modèle de champ moyen

Les modèles de type champ moyen sont souvent utilisés pour rendre compte de processus complexes. Ce type de modèle vise à décrire par une équation portant sur les distributions de taille, et non plus sur les entités directement, les lois d'échelles observées. Ce type de modèle fait généralement intervenir, les taux associés aux processus dans une (ou des) équations différentielles.

Modèle de Lifschitz, Slyosov et Wagner

Le mûrissement d'Ostwald, comme mentionné dans la section 2, a une loi d'échelle en $t^{1/3}$, c'est à dire que les volumes des objets soumis à ce processus augmentent comme la racine cubique du temps. Lifchitz, Slyozov et Wagner [Lifshitz and Slyozov, 1961, Wagner, 1961], ont tenté de rendre compte de cette loi d'échelle par des arguments mathématiques.

L'équation porte sur la distribution de taille n, et $n(R,t)$ représente le nombre d'objets de rayon R au temps t. Elle s'écrit de la façon suivante :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial n}{\partial t}(R,t) + \dfrac{\partial \left(V(R,t)n(R,t)\right)}{\partial R} = 0 \\ V(R,t) = \dfrac{1}{R}\left(\theta - \dfrac{2}{R}\right) \\ \theta = \dfrac{2\int n dR}{\int Rn(R,t)dR} \end{cases} \tag{5.14}$$

Ce modèle conduit à une dynamique dans laquelle les particules plus grosses que la moyenne grandissent tandis que les particules plus petites que la moyenne deviennent de plus en plus petites. Ce modèle ne permet pas toujours de représenter avec précision les lois d'échelles observées [Pego, 2007].

Équation de coalescence de Smoluchowski

L'équation de Smoluchowski, introduite en 1917 [Von Smoluchowski, 1917], permet de décrire l'évolution de particules pouvant coalescer (ou s'agréger) pour former des

Noyau	Application
$(x^{1/3}+y^{1/3})(x^{-1/3}+y^{-1/3})$	Mouvement brownien (continuum)
$(x^{1/3}+y^{1/3})^2(x^{-1}+y^{-1})^{1/2}$	Mouvement brownien (molécules libres)
$(x^{1/3}+y^{1/3})^2\|(x^{1/3}-y^{1/3}\|$	Gravitation
$(x^{1/3}+y^{1/3})^3$	Particules agitées dans un bécher
$(x^{1/3}+y^{1/3})^3(1-\eta)(1-\xi)$	Particules agitées dans un bécher avec prise en compte de la surface couverte

TABLE 5.2 – Noyaux pour des particules de volume x et y. La surface couverte est notée respectivement η et ξ pour les particules de volumes respectivement x et y dans le dernier noyau.[Aldous, 1999], [Whitesides and Ross, 1995].

particules plus grosses. Elle est généralement utilisée dans l'étude d'aérosols ou encore la formation de planètes [Wattis, 2006]. En biologie, elle est a été utilisée pour décrire la dynamique d'endosomes [Foret et al., 2012] ou encore la fusion de corps lipidiques [Trigui, 2014, Trigui et al., 2012], afin de mieux comprendre l'influence des protéines sur le taux de fusion.

On note $n(x,t)$ la quantité, au temps t, de particules de taille x dans un volume fixé. La taille représente en général une masse ou un volume. On introduit alors le noyau de fusion $\kappa(x,y)$ de sorte que le nombre de coalescence de particules de tailles comprises entre x et $x+dx$ avec des particules de tailles comprises entres y et $y+dy$, dans un intervalle de temps dt soit donné par $\kappa(x,y)n(x,t)n(y,t)dxdydt$. Le noyau de fusion $\kappa(x,y)$ vérifie :

$$\begin{aligned} \kappa(x,y) &= \kappa(y,x) \\ \kappa(x,y) &\geq 0 \end{aligned} \tag{5.15}$$

L'évolution de la distribution de taille est donc décrite par l'équation :

$$\frac{\partial n}{\partial t}(x,t) = \frac{1}{2}\int_0^x \kappa(x-y,y)n(x-y,t)n(y,t)dy - \int_0^\infty \kappa(x,y)n(x,t)n(y,t)dy \tag{5.16}$$

Le premier terme de cette équation représente la formation de particules de taille x par la coalescence de particules de tailles $x-y$ avec des particules de taille y. Le second terme représente la disparition de particules de taille x par coalescence avec d'autres particules.

L'une des principales difficultés rencontrées lors de l'utilisation d'un tel modèle dans une application donnée consiste généralement à trouver le noyau approprié. Le tableau 5.2 donne quelques noyaux et leurs applications. Les comportements des solutions sont fortement dépendants du choix du noyau.

L'existence et l'unicité de solutions ont été étudiées notamment dans [Dubovskii, 1994]. L'un des problèmes rencontrés concerne notamment l'existence et l'unicité de solutions pour certains types de noyaux qui conduisent à des comportements particuliers. Sous certaines conditions et pour certains noyaux ($\kappa(x,y)=xy$, par exemple), il existe un temps à partir duquel certains moments de la solution ne sont plus finis. Ce phénomène est appelé gélation et peut être interprété comme l'apparition d'un objet de taille «infinie». Ce phénomène est largement traité dans la littérature [Aldous, 1999, Dubovskii and Stewart, 1996, Wattis, 2006].

Pour certains noyaux, $\kappa(x, y) = 1$, $\kappa(x, y) = x+y$ et $\kappa(x, y) = xy$, et pour certains types de conditions initiales, il est possible d'obtenir la solution analytique de cette équation (voir [Schumann, 1940] et les références dans [Aldous, 1999]).

5.2.4 Proposition de modèle

Dans cette section, on se propose de mettre au point un modèle de l'évolution des distributions de volumes de corps lipidiques chez les jeunes embryons d'*A. thaliana* afin d'étudier l'influence de la composition protéique des corps lipidiques sur les taux de fusion de corps lipidiques. L'objectif est dans un premier temps d'estimer les taux de fusion puis dans un second temps de comparer les taux de fusion de plusieurs génotypes.

Le modèle représente l'accumulation des lipides sur les premières étapes du développement de l'embryon, c'est à dire jusqu'à 10 jours après la floraison. Sur la base des observations des chapitres précédents sur la fusion des corps lipidiques et des résultats de la littérature sur les mécanismes à l'œuvre lors du développement des jeunes embryons d'*A. thaliana*, on fait les hypothèses suivantes sur les mécanismes d'accumulation des lipides :

(i) Les corps lipidiques peuvent fusionner entre eux quels que soient leurs volumes. Nous avons en effet, observé dans la chapitre 4, conformément aux résultats présentés dans [Miquel et al., 2014], que la fusion peut avoir lieu entre corps lipidiques de volume parfois très différents.

(ii) On suppose que la fusion de deux corps lipidiques conserve le volume de lipides neutres.

(iii) La phase considérée correspond à une phase d'accumulation de lipides neutres. C'est à dire que, pour un volume fixé de l'embryon, le volume total de lipides neutres augmente au cours du développement. On suppose connue l'évolution du volume total de lipides neutres pour un volume fixé de l'embryon [Baud et al., 2002].

(iv) On suppose qu'aucune mobilisation des lipides n'a lieu. De plus, aucun événement de fission n'a été observé à ce stade de développement chez les embryons d'*A. thaliana*, on ne considère donc pas ces deux phénomènes dans la suite.

(v) On suppose également qu'il n'y a pas de synthèse locale de lipides neutres au niveau de la surface des corps lipidiques.

(vi) On suppose que les corps lipidiques peuvent être produits *de novo*. On sait en effet que le nombre de corps lipidiques peut augmenter au cours du développement [Miquel et al., 2014], et on a supposé qu'aucun événement de fission n'a lieu (iv).L'augmentation du nombre de corps lipidiques est donc liée à la production *de novo* uniquement.

(vii) On suppose que la formation de corps lipidiques *de novo* a lieu à un volume unique, qui peut varier avec le temps. On ne dispose cependant pas de modèle pour l'évolution du volume de création des corps lipidiques. Les diamètres des corps lipidiques créés (supposés sphériques) sont supposés relativement petits, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres.

(viii) On suppose que la distribution de volume initiale est concentrée autour d'un certain volume. L'ordre de grandeur des diamètres est aussi supposé de quelques centaines de nanomètres mais n'est pas connu explicitement.

(ix) On suppose que la probabilité de fusion pour un corps lipidique ne dépend pas du volume considéré.

On note, pour un volume fixé de l'embryon, $n(x,t)$ la quantité de corps lipidiques de volume x, au temps t. On note $M_k(t)$ le moment d'ordre k de la distribution de volume. On a donc :

$$M_k(t) = \int_0^{+\infty} x^k n(x,t) dx \tag{5.17}$$

Les moments de la distribution de volume représentent des quantités d'intérêt. En effet, le moment d'ordre 0 représente la quantité de corps lipidiques contenu dans le volume considéré et le moment d'ordre 1 représente le volume total de lipides neutres contenu dans le volume considéré de l'embryon.

L'hypothèse (iii), indique que le volume total de lipides neutres dans le volume de l'embryon considéré est connu. On suppose que l'évolution du volume de lipides neutres est exponentielle avec un paramètre λ. On note A_1 le volume initial. Le moment d'ordre 1 de la distribution de volume est donc donné par :

$$M_1(t) = A_1 e^{\lambda t} \tag{5.18}$$

D'après l'hypothèse (viii), la distribution initiale $n(x,0) = n_0(x)$ est concentrée autour d'un certain volume inconnu. Cela revient à supposer que la variance de la distribution est proche de 0. En utilisant, l'hypothèse (iii), et l'évolution de la masse totale (5.18), on obtient la relation suivante sur le moment d'ordre 2 de la condition initiale :

$$M_2(0) = A_1^2 \tag{5.19}$$

On note $j(x,t)$ la quantité de corps lipidiques de volume x injectée à l'instant t, conformément à l'hypothèse (vi). On note $\gamma_k(t)$ le moment d'ordre k de la distribution d'injection, défini par :

$$\gamma_k(t) = \int_0^{+\infty} x^k j(x,t) dx \tag{5.20}$$

On ne connaît pas de modèle pour l'injection. On sait en revanche que l'ajout de matière provient uniquement de la création *de novo* de corps lipidiques. On a donc la relation suivante sur l'évolution du volume total de lipides neutres :

$$\frac{dM_1}{dt}(t) = \gamma_1(t) \tag{5.21}$$

D'après l'hypothèse (vii), l'injection se fait à un volume unique, c'est à dire que la variance de la distribution d'injection est nulle. Cette hypothèse se traduit à partir du moment d'ordre 2 de la façon suivante :

$$\gamma_2(t) = \gamma_1(t)^2 \tag{5.22}$$

Les hypothèses (ii), (iv) et (i) indiquent que l'on peut décrire l'évolution de la distribution de volume à partir d'une équation de Smoluchowski à laquelle on ajoute un terme d'injection afin de prendre en compte la création *de novo* de corps lipidiques. L'hypothèse (ix) suggère que le noyau de fusion ne dépend pas des volumes, il est donc constant et on note K sa valeur. On a donc :

$$\kappa(x,y) = K = constante. \tag{5.23}$$

L'évolution de la distribution de volume s'écrit alors :

$$\frac{\partial n}{\partial t}(x,t) = \frac{K}{2}\int_0^x n(x-y,t)n(y,t)dy - K\int_0^\infty n(x,t)n(y,t)dy + j(x,t) \tag{5.24}$$

Il est possible d'obtenir l'évolution des moments de la distribution de volume en utilisant la transformée de Laplace. La transformée de Laplace d'une fonction locale intégrable à support positif est définie, pour $s \in$, de la façon suivante :

$$h(s) = \int_0^\infty f(u)e^{-su}du \tag{5.25}$$

La transformée de Laplace peut être définie pour les distributions à support bornée. Ainsi, on peut définir la transformée de Laplace de l'impulsion δ. On a alors : $\int_0^{+\infty} e^{-su}\delta(u)du = 1$.

On peut déduire les moments de la fonction f (si elle est C^k) directement à partir des dérivées de la transformée de Laplace en 0 par la relation :

$$M_k = (-1)^k \left.\frac{d^k h}{ds^k}\right|_{s=0} \tag{5.26}$$

Où M_k représente le moment d'ordre k de f.

Dans la suite, on note $h(s,t)$ la transformée de Laplace de la distribution de volume et $\Gamma(s,t)$ la transformée de Laplace de la distribution d'injection. En appliquant cette transformation à l'équation (5.24), on trouve :

$$\frac{\partial h}{\partial t}(s,t) = \frac{K}{2}h^2(s,t) - Kh(0,t)h(s,t) + \Gamma(s,t) \tag{5.27}$$

Cette équation peut être obtenue aisément à partir de (5.24) en appliquant la transformation de Laplace et en remarquant que l'on peut inverser l'ordre des intégrations pour le premier terme à droite grâce à la positivité de $n(x,t)$:

$$\begin{aligned}\int_0^{+\infty}\int_0^x e^{-sx}n(x-y,t)n(y,t)dydx &= \int_0^{+\infty}\int_y^{+\infty} e^{-sx}n(x-y,t)n(y,t)dxdy \\ &= \int_0^{+\infty}\int_0^{+\infty} e^{-sx}n(x-y,t)n(y,t)dxdy\end{aligned}$$

En opérant le changement de variables $z = x - y$, on arrive au résultat suivant :

$$\begin{aligned}\int_0^{+\infty}\int_0^{+\infty} e^{-sx}n(x-y,t)n(y,t)dxdy &= \int_0^{\infty}\int_0^{\infty} e^{-s(z+y)}n(z,t)n(y,t)dzdy \\ &= \int_0^{\infty} e^{-sz}n(z,t)dz \int_0^{\infty} e^{-sy}n(y,t)dy \\ &= h^2(s,t)\end{aligned}$$

En utilisant (5.26), on trouve pour les moments jusqu'à l'ordre 2 :

$$\dot{M}_0(t) = \gamma_0(t) - \frac{K}{2}M_0^2(t) \tag{5.28}$$

$$\dot{M}_1(t) = \gamma_1(t) \tag{5.29}$$

$$\dot{M}_2(t) = KM_1^2(t) + \gamma_2(t) \tag{5.30}$$

En général, on ne peut pas trouver une solution explicite pour le moment d'ordre 0. En revanche, on connaît $\gamma_1(t)$ d'après (5.18) et (5.21), et les moments d'ordre un et deux sont calculables explicitement. En utilisant les équations (5.18), (5.22) et (5.30), on trouve :

$$M_2(t) = \frac{KA_1 + \lambda^2 A_1^2}{2\lambda} e^{2\lambda t} + A_2 \tag{5.31}$$

où A_2 est une constante d'intégration qui vaut :

$$A_2 = -\frac{KA_1 + \lambda^2 A_1^2}{2\lambda} + M_2(0) \tag{5.32}$$

On utilisera ces relations dans la suite afin d'obtenir un estimateur du taux de fusion K.

La figure 5.3, présente des résultats de simulation de ce modèle pour différents taux de fusion et avec les mêmes paramètres initiaux et la même injection. Afin de pouvoir simuler l'évolution de la distribution, on s'est donné un modèle complet pour la distribution d'injection.

On constate notamment que la distribution de volume s'étend vers les plus gros objets au cours du temps. La figure 5.4 présente l'évolution de la masse totale du système, du nombre d'objets, et du volume moyen. On remarque que le nombre d'objets diminue dans un premier temps en raison de nombreuses fusions puis il augmente car l'injection de nouveaux objets compense la perte d'objets par fusion. On constate aussi que le volume moyen est plus élevé lorsque le taux de fusion est plus grand.

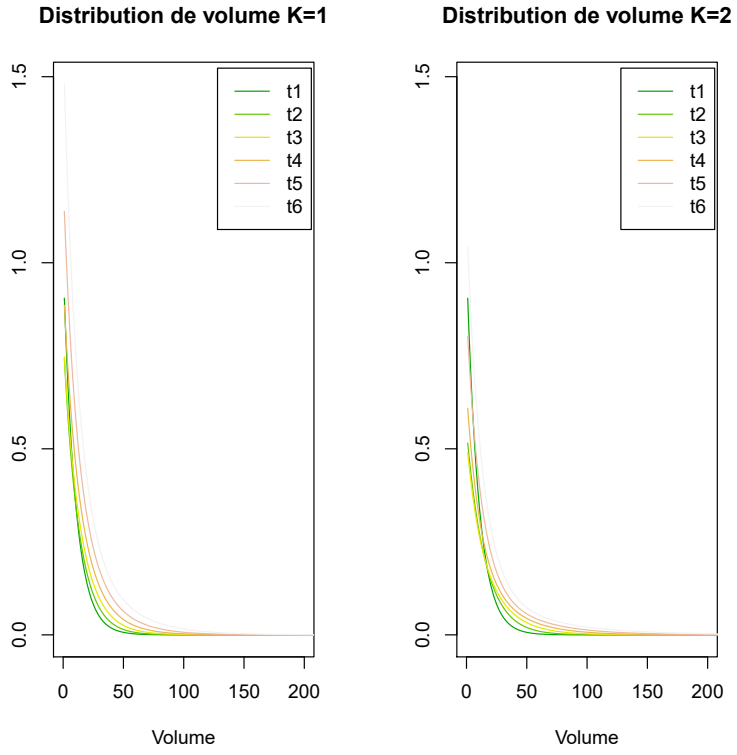


FIGURE 5.3 – Évolution des distributions de volumes des simulations du modèle 5.24.

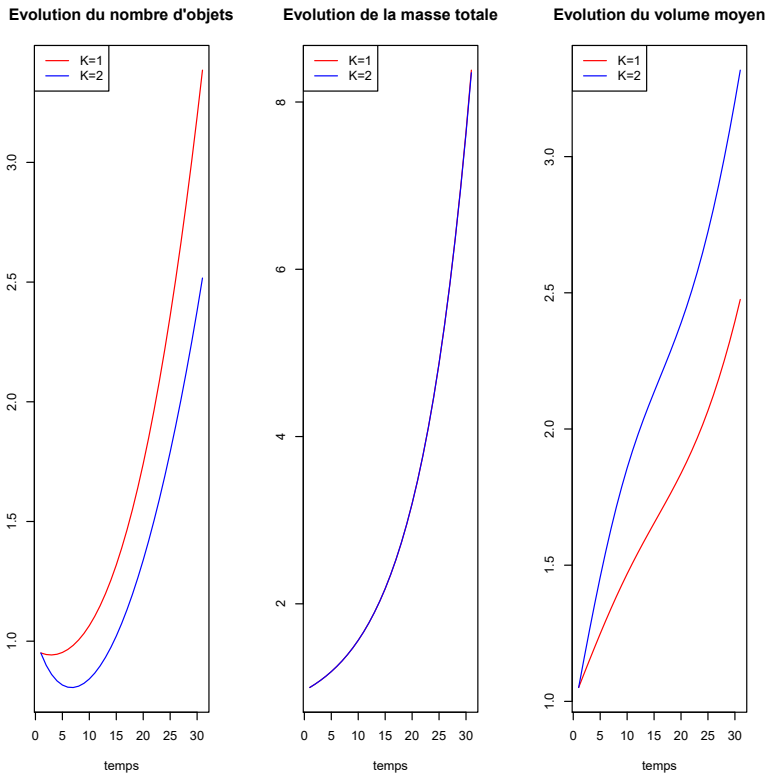


FIGURE 5.4 – Évolution du nombre d'objets, de la masse totale et du volume moyen pour des simulations du modèle 5.24.

5.3 Estimation de paramètres dans un modèle de coalescence

Cette section présente le problème d'estimation de paramètres et de comparaison des taux de fusion de plusieurs mutants. Le modèle statistique repose sur l'observation de plusieurs populations liées par des paramètres communs. Le modèle probabiliste pour chacune des populations est basé sur la solution d'une équation de coalescence avec un terme d'injection. Le calcul d'un estimateur du maximum de vraisemblance est coûteux car il nécessite la résolution numérique de l'équation différentielle. De plus, il nécessite de faire des hypothèses plus fortes sur le phénomène (notamment sur la distribution initiale et l'injection). Un estimateur basé sur les moments permet avec de faibles hypothèses sur le modèle d'estimer certains paramètres d'intérêts. Les mutants seront ensuite comparés les uns aux autres à l'aide d'estimateurs de ces paramètres.

5.3.1 Problème d'estimation de paramètres

Cette section présente le problème d'estimation et commente les techniques utilisables pour estimer les paramètres du modèle.

Modèle statistique

Pour étudier les mesures de volumes des corps lipidiques à partir d'images, nous allons mettre en place un modèle statistique et proposer un estimateur du taux de fusion des

gouttes. Dans un second temps, on utilisera cet estimateur pour comparer les mutants d'oléosines.

Les observations des volumes à l'instant j sont modélisées par des variables aléatoires indépendantes et identiquement distribuées, notées $X_{1,j}, \ldots, X_{N_j,j}$. Pour chaque instant $j \in \{1, \ldots, T\}$, leur densité de probabilité dépend du taux de fusion $K \in \ ^+$ commun à tous les instants. Cette densité dépend de la solution de l'équation (5.24). On l'obtient en normalisant par la quantité d'objets, donnée par le moment d'ordre 0. Cette densité est donnée par :

$$\bar{n}_j(x) = \frac{n(x, t_j)}{M_0(t_j)} \tag{5.33}$$

On peut aisément obtenir les moments de la variable aléatoire X_{ij} en fonction des moments de la distribution de volume par les relations :

$$\begin{aligned} E[X_{ij}] &= \frac{M_1(t_j)}{M_0(t_j)} \\ E[X_{ij}^2] &= \frac{M_2(t_j)}{M_0(t_j)} \end{aligned} \tag{5.34}$$

Ce problème d'estimation de densités paramétriques est assez particulier puisqu'il fait intervenir plusieurs échantillons provenant chacun d'un modèle spécifique mais qui sont liés par des paramètres communs et par une équation différentielle. Nous n'avons pas donné de modèle explicite pour la condition initiale et pour la distribution d'injection car on ne dispose pas d'information à leur sujet. On s'intéresse dans la suite à estimer le taux de fusion K à partir des $\left(X_{1j}, \cdots, X_{N_j j}\right)_{j=1,\cdots,T}$.

Les sections suivantes présentent les méthodes qui peuvent être utilisées pour résoudre ce problème et leurs avantages et inconvénients par rapport au problème considéré. Pour plus de généralités dans la présentation des méthodes, on notera $\theta \in \ ^k$ le paramètre à estimer.

Maximum de vraisemblance

Dans ce contexte, les résultats sur les estimateurs du maximum de vraisemblance ont été montrés par [Bradley and Gart, 1962]. On s'intéresse aux propriétés asymptotiques de cet estimateur.

La vraisemblance jointe s'écrit :

$$\phi = \prod_{j=1}^{T} \prod_{i=1}^{N_j} \bar{n}_j(X_{ij}; \theta) \tag{5.35}$$

L'estimateur du maximum de vraisemblance est alors défini par :

$$\hat{\theta} = \arg\max_{\theta \in \Theta} log\ \phi \tag{5.36}$$

Dans la suite, on considère qu'il est solution, pour $r = 1, \cdots, k$, des équations :

$$\frac{\partial log\ \phi}{\partial \theta_r} = 0 \tag{5.37}$$

Théorème 1 ***Consistance [Bradley and Gart, 1962]***
Sous des hypothèses sur la régularité des $\bar{n}_j$ et si $\hat{\theta}$ est solution de (5.37) pour tout $r \in 1, \ldots, k$, alors quand $N_j \to \infty$ avec $\mu_j = N_j \Big/ \sum_{l=1}^{T} N_l$ constant, $\hat{\theta}$ est un estimateur consistant du vrai paramètre θ.

Théorème 2 ***Normalité asymptotique [Bradley and Gart, 1962]***
Sous les mêmes hypothèses, si $\hat{\theta}$ est l'estimateur de maximum de vraisemblance et θ le vrai paramètre, alors quand $n \to \infty$, avec $N = \sum_{l=1}^{T} N_l$:

$$\sqrt{N}(\hat{\theta} - \theta) \xrightarrow{\mathcal{L}} \mathcal{N}(0, J_0^{-1}) \tag{5.38}$$

Où :

$$J_0 = - \sum_{j=1}^{T} \mu_j E\left[H_j(\theta)\right] \tag{5.39}$$

Où H_j est la matrice hessienne de $log(\bar{n}_j)$.

L'estimateur du maximum de vraisemblance est donc consistant et asymptotiquement normal sous les hypothèses de régularités vraies ici. Cependant, il est assez difficile à calculer en pratique puisqu'il nécessite de résoudre numériquement l'équation (5.24) un grand nombre de fois, cette opération étant coûteuse et imprécise [Ramsay et al., 2007].

Méthode des moments

La méthode des moments consiste à construire un estimateur à partir des moments empiriques et de l'expression analytique des moments de la variable aléatoire. Cette technique permet d'obtenir des estimateurs consistants et asymptotiquement normaux grâce à la loi des grands nombres et au théorème central limite.

On présente la méthode des moments (et des moments généralisés dans la suite) dans le cadre classique. On reprendra le cadre légèrement différent de populations associées considéré précédemment après la présentation de ces deux méthodes.

On considère un échantillon $X_1, \cdots, X_N$ de variables aléatoires indépendantes et identiquement distribuées de loi $\mathcal{F}$ de paramètres $\theta \in \Theta \subset \quad^k$. Si les moments jusqu'à l'ordre k existent et si on connaît leurs vraies valeurs μ_r^*, et si le système suivant a une solution, on a :

$$\mu_r(\theta) = E_\theta[X_i^r] = \mu_r^*, \qquad r = 1, \cdots, k \tag{5.40}$$

On ne connaît pas la valeur de $E_\theta[X_i^r]$, on la remplace par les moments empiriques $m_r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} X_i^r$, qui vérifient d'après la loi des grands nombres $m_r \xrightarrow{P} \mu_r^*$. L'estimateur des moments du paramètre θ est la solution du système :

$$\mu_r(\theta) = m_r, \qquad r = 1, \cdots, k \tag{5.41}$$

Cet estimateur est consistant et asymptotiquement normal (si les moments existent jusqu'à l'ordre $2k$). En revanche, les estimateurs des moments ne sont généralement pas asymptotiquement efficaces.

Méthode des moments généralisés

Il est possible de généraliser ce principe en utilisant des fonctions de la variable aléatoire, on parle alors d'estimateur des moments généralisés [Hansen, 1982]. Supposons que l'on ait une relation du type :

$$\mu_r(\theta) = E_\theta[\phi_r(X_i)] = \mu_r^*, \qquad r = 1, \cdots, k \tag{5.42}$$

De façon analogue au cas précédent, on remplace $E_\theta[\phi_r(X_i)]$ par une version empirique :

$$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \phi_r(X_i), \qquad r = 1, \cdots, k \tag{5.43}$$

En général, il faut résoudre un système d'équations non linéaires pour trouver la valeur du paramètre. En pratique, on définit l'estimateur des moments généralisés comme solution d'un problème d'optimisation.

Définition 1 ***Estimateur des moments généralisés***
Supposons que l'on ait $\phi_1, \ldots, \phi_r$ vérifiant (5.42)*. Soit $\Phi(\theta)$ le vecteur de coordonnées :*

$$\Phi_r(\theta) = \mu_r(\theta) - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \phi_r(X_i), \qquad r = 1, \cdots, k \tag{5.44}$$

Alors l'estimateur

$$\hat{\theta} = \underset{\theta \in \Theta}{arg\,min}\ ||\Phi(\theta)||_W \tag{5.45}$$

où $||\cdot||_W$ est une norme euclidienne transformée, telle que $||x||_W = x^t W x$, avec W une matrice symétrique définie positive (qui peut dépendre des données), est consistant et asymptotiquement normal.

Il est possible de choisir la matrice W de sorte que l'estimateur soit asymptotiquement efficace dans cette classe d'estimateurs. Si on a le résultat de normalité asymptotique suivant :

$$\sqrt{N}\Phi(\hat{\theta}) \longrightarrow \mathcal{N}(0, S) \tag{5.46}$$

Alors on aura :

$$\sqrt{N}(\hat{\theta} - \theta) \longrightarrow \mathcal{N}(0, V) \tag{5.47}$$

Où θ est le vrai paramètre. On a alors l'expression suivante pour la variance :

$$\begin{aligned} V &= (D^t W D)^{-1} D^t W S W D (D^t W D)^{-1} \\ D &= E_\theta \left[J\Phi(\theta) \right] \end{aligned} \tag{5.48}$$

Où $J\Phi(\theta)$ est la matrice jacobienne de $\Phi(\theta)$. La variance est minimale lorsque l'on choisit $W = S^{-1}$, ce choix permet d'obtenir l'estimateur des moments généralisés efficace dans cette classe d'estimateurs. La variance reste cependant supérieure à la borne de Cramer-Rao atteinte asymptotiquement par l'estimateur du maximum de vraisemblance.

Dans la suite, un estimateur similaire à l'estimateur des moments généralisés est utilisé. La différence principale repose dans l'utilisation des $X_{1j}, \cdots, X_{N_j j}$ $(j = 1, \cdots, T)$.

Autres méthodes

De nombreuses méthodes classiques peuvent être utilisées pour estimer des paramètres dans des modèles basés sur des équations différentielles comme les méthodes bayésiennes ou encore la méthode des moindres carrés non linéaire. Cette méthode est utilisée pour l'estimation de paramètres dans le cadre d'équations similaires à (5.24) [Ackleh, 1997]. Ce type de méthode a été utilisé dans [Foret et al., 2012] pour estimer les paramètres d'un modèle de fusion et fission d'endosomes. L'estimation des paramètres du modèle est faite à l'état stationnaire par une méthode des moindres carrés.

Ces méthodes, comme celle du maximum de vraisemblance présentent des difficultés techniques [Ramsay et al., 2007]. En particulier, elles ont une complexité numérique importante car il faut intégrer les équations différentielles et calculer les gradients de façon répétée pour résoudre le problème d'optimisation. De plus, les critères utilisés dans les moindres carrés non linéaires présentent généralement des minima locaux et des problèmes d'identifiabilité. Pour ces raisons, des techniques adaptées aux cas des équations différentielles ont été développées.

Deux méthodes sont souvent utilisées, le *gradient matching* [Gugushvili et al., 2012, Brunel et al., 2008] et le *generalised smoothing* [Ramsay et al., 2007, Qi and Zhao, 2010, Brunel et al., 2015]. La première utilise des techniques d'estimation non paramétriques pour estimer $\hat{X}$ et sa dérivée $\dot{\hat{X}}$. Un estimateur est ensuite défini comme minimum d'une distance. Ces estimateurs sont consistants et peuvent être facilement calculés. En revanche, ces estimateurs ne sont généralement pas efficaces. La seconde méthode utilise l'expression dans une base fonctionnelle de la solution de l'équation différentielle. Un critère d'écart est donné et minimisé dans un algorithme itératif. Cette méthode utilise un hyperparamètre à sélectionner afin de contrôler l'influence de l'approximation sur l'estimation.

Des méthodes d'estimation Bayésienne peuvent être utilisée pour estimer des taux de fusion. Le travail d'estimation de paramètres pour un modèle d'évolution des distributions de volumes présenté dans [Trigui, 2014] repose la résolution d'un système d'équations différentielles provenant de la discrétisation d'une équation similaire à (5.24).

Ces méthodes supposent que l'on dispose d'observations bruitées des distributions de taille. On dispose de mesures de volumes de corps lipidiques à différents instants. A partir de ces mesures, il est possible de reconstruire la distribution de taille en choisissant des classes de taille. On peut notamment utiliser les méthodes de *binning* afin de se ramener à un problème de régression à partir des mesures de volumes. Dans la suite, on propose d'utiliser des relations sur les moments des distributions de taille pour construire un estimateur du taux de fusion. Les auteurs de [Armiento et al., 2016] utilisent les moments de la solution d'une équation aux dérivée partielles, issue d'un modèle de Lifshitz-Slyozov, pour estimer les conditions initiales par une méthode des moindres carrés régularisés.

5.3.2 Estimation du taux de fusion

On s'intéresse à l'estimation du taux de fusion, c'est à dire au paramètre K dans l'équation (5.24). Avec des hypothèses faibles sur les mécanismes, il est possible d'obtenir un estimateur pour K, qui pourra servir par la suite à comparer plusieurs populations.

Dans la suite, on utilisera les notations du tableau 5.3.

Notation	Signification
K	Fréquence de fusion
A_1	Paramètre du modèle d'évolution du volume total de lipides neutres (5.18)
λ	Paramètre du modèle d'évolution du volume total de lipides neutres (5.18)
$M_k(t)$	Moment d'ordre k de $n(x,t)$
$j(x,t)$	Injection
$\gamma_k(x,t)$	Moment d'ordre k de l'injection
t_j	$j^{ème}$ temps d'observation
x_{ij}	$i^{ème}$ mesure de volume au temps t_j
$n(x,t)$	Solution de l'équation 5.24
$\bar{n}(x,t)$	Densité de probabilité $\bar{n}(x,t) = \frac{n(x,t)}{M_0(t)}$
$h(s,t)$	Transformée de Laplace de $n(x,t)$
$m_k(t_j)$	Moment empirique d'ordre k

TABLE 5.3 – Tableau récapitulatif des paramètres et notations.

Estimateur des moments généralisés

A partir des équations (5.34), on obtient les relations suivantes sur les moments de la distribution de volume pour $j \in 1, \ldots, T$:

$$M_1(t_j)E[X_{1j}^2] - M_2(t_j)E[X_{1j}] = 0 \tag{5.49}$$

En utilisant (5.18), (5.31), (5.32) et (5.19), on peut réécrire cette équation sous la forme :

$$e^{\lambda t}E[X_{1j}^2] - \left(\frac{K}{2\lambda}(e^{2\lambda t} - 1) + \frac{A_1\lambda}{2}(e^{2\lambda t} - 1) + 1\right)E[X_{1j}] = 0 \tag{5.50}$$

On peut construire un estimateur des moments généralisés de K en utilisant les moments empiriques d'ordre 1 et 2 :

$$\begin{aligned} m_1(t_j) &= \frac{1}{N_j}\sum_{i=1}^{N_j} X_{ij} \\ m_2(t_j) &= \frac{1}{N_j}\sum_{i=1}^{N_j} X_{ij}^2 \end{aligned} \tag{5.51}$$

En substituant les moments empiriques dans (5.50), on définit le vecteur suivant :

$$\Phi(K) = \begin{pmatrix} \phi_1(K) \\ \vdots \\ \phi_T(K) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} m_1(t_1) - m_2(t_1)\left(\frac{K+\lambda^2 A_1}{2\lambda}(e^{\lambda t_1} - e^{-\lambda t_1}) + e^{-\lambda t_1}\right) \\ \vdots \\ m_1(t_T) - m_2(t_T)\left(\frac{K+\lambda^2 A_1}{2\lambda}(e^{\lambda t_T} - e^{-\lambda t_T}) + e^{-\lambda t_T}\right) \end{pmatrix} \tag{5.52}$$

On peut définir un estimateur consistant et asymptotiquement normal par la méthode des moments généralisés (5.45) :

$$\hat{K} = \underset{K \in \ ^+}{arg\ min}\ ||\Phi(K)||_W \tag{5.53}$$

On pose $N = \sum_j N_j$. Dans le cas où $N_j \to \infty$ avec $\mu_j = \frac{N_j}{N} = constante$, cet estimateur a les propriétés suivantes :

$$\hat{K} \xrightarrow{p} K \tag{5.54}$$

$$\sqrt{N}\left(\hat{K} - K\right) \xrightarrow{\mathcal{L}} \mathcal{N}(0, V) \tag{5.55}$$

De façon similaire au résultat présenté à la section 5.3.1, on obtient un estimateur efficace en prenant $W = S^{-1}$, avec S la variance de $\sqrt{N}\Phi(\hat{K})$.

Résultats de simulation

On s'intéresse aux propriétés de l'estimateur défini par (5.53). En particulier, on va étudier par simulation l'évolution de l'erreur quadratique moyenne et de la variance en fonction du nombre de données par instant.
L'erreur quadratique moyenne est donnée par :

$$R = E\left[(K - \hat{K})^2\right] \tag{5.56}$$

Pour évaluer la qualité d'ajustement du modèle, on étudiera aussi une quantité basée sur l'équation (5.50). On appelle résidu la quantité :

$$r = \sqrt{\sum_j \left(\frac{M_2(t_j)}{M_1(t_j)} - \left(\frac{\hat{K} + \lambda^2 A_1}{2\lambda}(e^{\lambda t_j} - e^{-\lambda t_j}) + e^{-\lambda t_j}\right)\right)^2} \tag{5.57}$$

Les résidus permettent de comparer l'estimation à une quantité basée sur les moments empiriques à chaque instant considéré. On a recours à cette quantité car on ne peut pas reconstruire la distribution complète à partir de l'estimateur du taux de fusion.

On comparera l'estimateur (5.53) à l'estimateur des moments qui minimise l'erreur d'ajustement :

$$\begin{aligned} \tilde{K} &= arg\min_j \sqrt{\sum_i \left(\frac{M_2(t_i)}{M_1(t_i)} - \left(\frac{\bar{K} + \lambda^2 A_1}{2\lambda}(e^{\lambda t_i} - e^{-\lambda t_i}) + e^{-\lambda t_i}\right)\right)^2} \\ \bar{\theta}_j &= \left[\frac{M_2}{M_1} - e^{-\lambda t} - \frac{\lambda A_1}{2}(e^{\lambda_t} - e^{-\lambda_t})\right] \frac{2\lambda}{e^{\lambda_t} - e^{-\lambda_t}} \end{aligned} \tag{5.58}$$

La variance de cet estimateur sera calculée par une procédure *bootstrap*. De même la variance de l'estimateur de moments généralisés (5.53) sera calculée par *bootstrap*.

Les résultats de l'étude par simulation sont donnés sur la figure 5.5. On constate notamment que l'estimateur des moments généralisés a un biais plus important que l'estimateur (5.58). En revanche, l'estimateur des moments généralisés a une variance plus petite, ce qui en fait un choix plus attractif pour mettre en place une procédure de test. Enfin, l'estimateur des moments généralisés a une meilleure qualité d'ajustement.

5.3.3 Comparaison de populations

On souhaite comparer deux populations, dont les paramètres sont respectivement K_1 et K_2. On va utiliser l'estimateur (5.53) pour mettre en place une procédure de comparaison des taux de fusion.

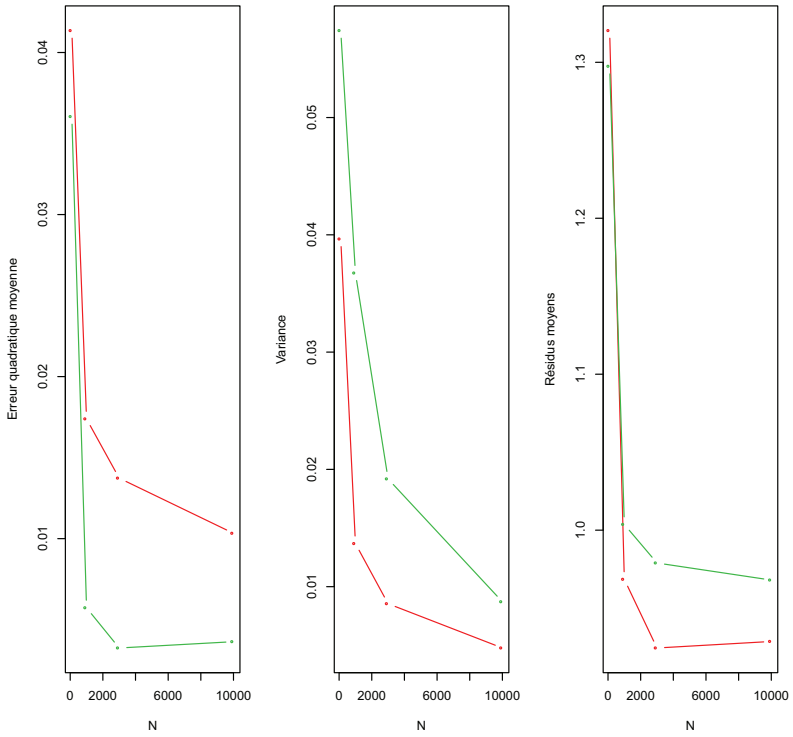


FIGURE 5.5 – Erreur quadratique moyenne, variance et résidus moyen en fonction du nombre de données disponibles par instant. Les courbes rouges correspondent à l'estimateur (5.53), les vertes à (5.58).

Hypothèses de modélisation

On suppose que les distributions de volumes de deux populations sont régies par l'équation (5.24). On fait en plus les hypothèses suivantes :

— On suppose que les deux populations ont les mêmes conditions initiales.

— On suppose que l'injection est la même pour les deux populations. Plusieurs travaux de recherche sur les corps lipidiques de plantes ont suggéré que l'absence d'oléosine chez les mutants n'affecte pas ou peu la production des lipides neutres [Miquel et al., 2014, D'Andrea, 2016].

— On suppose que l'on connaît la valeur du paramètre λ. Cette valeur est calculée à partir de données issues de [Baud et al., 2002]. La valeur calculée à partir de ces données est $\lambda = 0.8629$. On choisit d'étudier un volume de l'embryon tel que le volume initial de lipides neutres vérifie : $A_1 = 1$.

A ces hypothèses s'ajoutent les hypothèses de modélisation faites dans la section 5.2.4.

Test de comparaison des taux de fusion

On souhaite comparer les taux de fusion K_1 et K_2 des deux populations. En particulier, on cherche à savoir si K_1 est égal ou inférieur à K_2. Ainsi on teste l'hypothèse :

$$H_0 : K_1 = K_2 \tag{5.59}$$

contre :

$$H_1 : K_1 < K_2 \tag{5.60}$$

D'après (5.55), on a sous H_0 :

$$\hat{K}_1 - \hat{K}_2 \sim \mathcal{N}(0, V_1 + V_2) \tag{5.61}$$

Les quantités V_1 et V_2 sont les variances des estimateurs $\hat{K}_1$ et $\hat{K}_2$ respectivement. On estimera ces quantités par $\hat{V}_1$ et $\hat{V}_2$, calculée par *bootstrap*. On définit la statistique de test suivante :

$$\hat{S} = \frac{\hat{K}_1 - \hat{K}_2}{\sqrt{\hat{V}_1 + \hat{V}_2}} \tag{5.62}$$

Sous l'hypothèse H_0 elle vérifie :

$$\hat{S} \sim \mathcal{N}(0, 1) \tag{5.63}$$

On peut donc définir une région de rejet de l'hypothèse H_0 avec un risque α :

$$R = \left\{ \hat{S} < q_\alpha \right\} \tag{5.64}$$

Où q_α est le quantile d'ordre α de la loi normale centrée réduite.

5.3.4 Résultats

Estimation des taux de fusion

On peut estimer les taux de fusion pour chacun des mutants à partir de l'estimateur défini par (5.53). Pour cela, on utilise le jeu de données présenté dans la partie 5.1. Le tableau 5.4 donne des précisions sur le nombre de données par jour d'observation et les résultats de l'estimation du taux de fusion. On constate que le type sauvage *col0* a un

taux de fusion inférieur à celui des mutants. De même, le triple mutant *s1s3s4* semble avoir un taux de fusion plus élevé que tous les autres.

La figure 5.6 présente l'ajustement du rapport des moments d'ordre 2 et d'ordre 1 des distributions de volume. On constate que les ajustements semblent être assez bons pour le sauvage et les mutants simples et doubles. En revanche, il semble que l'évolution soit sous-estimée pour le triple mutant. Il se peut que le modèle ne soit plus valable pour le triple mutant parce que l'absence de trois oléosines entraîne une trop forte dérégulation.

Ces résultats suggèrent que le modèle semble être assez bien adapté pour décrire les données. Ainsi il semble possible d'expliquer l'évolution de moments d'ordre 1 et 2 des distributions de volume à partir d'un modèle relativement simple. Ce modèle est composé d'un terme de coalescence des gouttes avec un taux de fusion indépendant du volume et un terme d'injection avec un volume unique mais qui peut dépendre du temps. Il n'est pas possible à partir de cet estimateur de retrouver les distributions de volume car il faut préciser le terme d'injection. Il serait intéressant de proposer un modèle d'injection qui donnerait à chaque instant la taille des objets injectés. Il serait alors possible de comparer les distributions de volume et d'évaluer la qualité du modèle de façon plus globale.

	6	7	8	9	10	$\hat{K}$	
col0	807	952	907	1048	587	0.89	$\pm$0.49
s1	272	1136	1634	2117	1070	2.22	$\pm$0.18
s3	542	789	1766	2264	1011	1.61	$\pm$0.5
s1s3	1570	585	3015	2061	1474	2.07	$\pm$0.40
s1s4	484	1052	1721	1837	-	1.53	$\pm$0.35
s3s4	582	836	1541	613	1593	2.24	$\pm$0.43
s1s3s4	343	1138	1886	1385	1229	2.84	$\pm$0.24

TABLE 5.4 – Résultats de l'estimation des fréquences de fusion pour chaque génotype. Le tableau indique le nombre de données disponibles par jour et la valeur de $\hat{K}$ ainsi qu'un intervalle de confiance à 95%. Le paramètre a été multiplié par 1000 pour plus de lisibilité.

Comparaison des taux de fusion

A partir du modèle (5.24) et du test (5.64), on peut vérifier à partir des données un certain nombre d'hypothèses en lien avec les mutants d'oléosines. Dans la suite, les tests sont effectués avec un seuil critique de 5% et on utilise une correction de Bonferroni.

Hypothèse 1 - Effet des mutations On s'intéresse à l'impact des mutations sur le taux de fusion. Nous allons donc comparer le type sauvage *col0* aux mutants disponibles. Le type sauvage exprime toutes les oléosines alors que les types mutants n'expriment pas certaines oléosines. De nombreuses études suggèrent que la présence des oléosines limite la fusion. Ainsi, on peut penser que le taux de fusion des corps lipidiques est plus important chez les mutants n'exprimant pas certaines oléosines.
On peut utiliser le test (5.64) pour vérifier cette hypothèse. Elle se traduit par les conditions suivantes :

$$K_{col0} < K_{s1,s3,s1s3,s1s4,s3s4,s1s3s4} \tag{5.65}$$

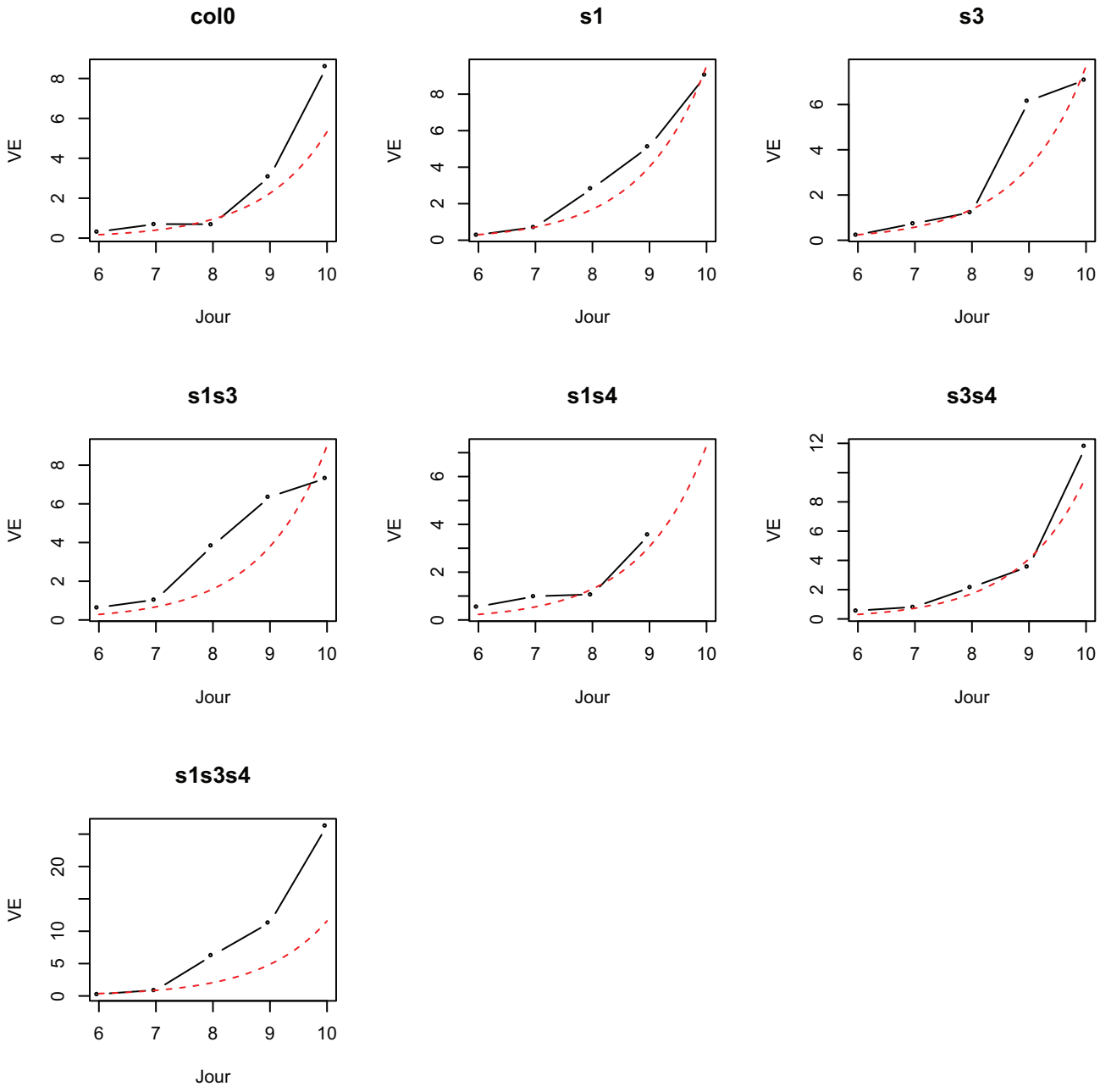


FIGURE 5.6 – Ajustement du rapport des moments d'ordre 2 et 1 à chaque instant et pour chaque génotype. La courbe rouge représente $\frac{K+\lambda^2 A_1}{2\lambda}(e^{\lambda t} - e^{-\lambda t_1}) + e^{-\lambda t}$ et la courbe noire représente $\frac{M_2}{M_1}$.

	s1	s3	s1s3	s1s4	s3s4	s1s3s4
col0	$<$	$<$	$<$	$<$	$<$	$<$

TABLE 5.5 – Test de l'hypothèse (5.65). Le signe "$<$" signifie que l'hypothèse nulle du test (5.64) est rejetée.

Le tableau 5.5 donne les résultats de chacun des tests. On constate que l'hypothèse (5.65) est vérifiée. On peut considérer que le type sauvage a bien un taux de fusion inférieur à celui des mutants. On peut en conclure que les oléosines semblent avoir un impact sur le taux de fusion. En particulier, l'absence d'oléosines semble impliquer un taux de fusion plus élevé.

Hypothèse 2 - Effet des doubles et triple mutations On peut maintenant s'interroger sur l'effet des mutations doubles et triples. On cherche alors à savoir si les doubles mutants *s1s3, s1s4* et *s3s4* ont des taux de fusion plus élevés que les mutants simples *s1* et *s3* et si le triple mutant a un taux de fusion plus élevé que les mutants simples et doubles. On veut donc tester si l'hypothèse suivante est vraie :

$$\begin{cases} K_{s1,s3} < K_{s1s3,s1s4,s3s4,s1s3s4} \\ K_{s1s3,s1s4,s3s4} < K_{s1s3s4} \end{cases} \tag{5.66}$$

	s1s3	s1s4	s3s4	s1s3s4
s1	$=$	$=$	$=$	$=$
s3	$=$	$=$	$<$	$=$
s1s3	-	-	-	$=$
s1s4	-	-	-	$=$
s3s4	-	-	-	$=$

TABLE 5.6 – Test de l'hypothèse (5.66). Le signe "$<$" signifie que l'hypothèse nulle du test (5.64) est rejetée et le signe "$=$" signifie que l'hypothèse nulle est acceptée.

Le tableau 5.6 donne les résultats de chacun des tests de cette hypothèse. On ne peut pas conclure que l'hypothèse (5.66) est vraie. Il semble en effet que certains tests conduisent à ne pas rejeter l'égalité des taux de fusions entre les mutants. On ne peut donc pas conclure que le nombre de mutations entraîne un taux de fusion plus élevé.

Hypothèse 3 - Effet de l'abondance des oléosines Enfin, on peut se demander si la quantité d'oléosine a un impact sur le taux de fusion. Le tableau 2.4 indique l'abondance des oléosines. La surface des corps lipidiques est moins couverte chez les mutants que chez le sauvage. De plus l'oléosine s3 est plus abondante que l'oléosine s1. Il a été suggéré que l'abondance des oléosines a un impact sur le taux de fusion. Ainsi, plus il y aurait d'oléosines à la surface des corps lipidiques et moins le taux de fusion serait important. Cette hypothèse se traduit par :

$$\begin{cases} K_{col0} < K_{s1,s3,s1s3,s1s4,s3s4,s1s3s4} \\ K_{s1} < K_{s1s3,s1s4,s1s3s4} \\ K_{s3} < K_{s1s3,s3s4,s1s3s4} \\ K_{s1s3,s1s4,s3s4} < K_{s1s3s4} \end{cases} \tag{5.67}$$

	col0	s1	s3	s1s3	s1s4	s3s4	s1s3s4
col0	-	$<$	$<$	$<$	$=$	$<$	$<$
s1	-	-	-	$=$	$=$	-	$=$
s3	-	-	-	$=$	-	$<$	$=$
s1s3	-	-	-	-	-	-	$=$
s1s4	-	-	-	-	-	-	$=$
s3s4	-	-	-	-	-	-	$=$

TABLE 5.7 – Test de l'hypothèse (5.67). Le signe "$<$" signifie que l'hypothèse nulle du test (5.64) est rejetée et le signe "$=$" signifie que l'hypothèse nulle est acceptée.

Le tableau 5.7 présente les résultats de chacun des tests pour cette hypothèse. Il n'est pas possible de conclure que l'abondance des oléosines entraîne un taux de fusion plus élevé.

5.4 Discussion

Dans cette partie, on a mis en place une méthode d'estimation du taux de fusion d'un modèle de coalescence basé sur une équation différentielle à partir de mesures de volumes de corps lipidiques à différents instants du développement. L'estimateur des moments généralisés défini est consistant et asymptotiquement normal. Il présente l'avantage d'être calculé rapidement. De plus, il ne nécessite pas d'intégrer numériquement l'équation différentielle, contrairement à des estimateurs des moindres carrés ou du maximum de vraisemblance. Il n'est donc pas sujet à des imprécisions liées à l'intégration numérique. Cet estimateur peut servir de première étape dans la reconstruction de l'évolution des distributions de volumes. En effet, un modèle complet de l'injection et de la condition initiale permettrait de simuler le modèle et d'avoir recours aux méthodes de type moindres carrés ou maximum de vraisemblance et la connaissance apportée sur les taux de fusion peut être bénéfique pour l'estimation complète des distributions de volume. Cela permettra de mieux évaluer la qualité du modèle en comparant l'évolution estimée aux données réelles complètes et pas simplement à des statistiques résumant ces données.

L'estimation des taux de fusions sur différents génotypes a permis d'obtenir de bons ajustements de certaines statistiques des distributions de volumes de corps lipidiques. Ce résultat suggère que le modèle proposé semble adéquat. Un modèle avec un noyau de fusion indépendant du volume semble donc être adapté pour décrire l'évolution des distributions de volume des corps lipidiques. De plus, l'hypothèse d'injection à volume constant mais dépendante du temps semble être appropriée. Il serait intéressant d'étudier des modèles d'injection afin de pouvoir estimer les distributions de volume. En particulier, il serait intéressant de savoir si le volume des corps lipidiques formés évolue avec le temps ou reste constant.

Les estimateurs calculés peuvent être utilisés notamment dans le cadre de modèle d'extraction de l'huile végétale [Campbell and Glatz, 2009]. Les modèles utilisés dans l'étude de l'extraction de l'huile utilisent des paramètres d'extraction basés sur des hypothèses de volume de corps lipidiques et des hypothèses sur la coalescence des corps lipidiques. La connaissance de valeurs pour ces paramètres peut être intéressante. De plus, la compré-

hension du rôle des oléosines sur la fusion des corps lipidiques peut être particulièrement utile pour affiner ce type de modèles.

L'utilisation sur des jeux de données réels permet de vérifier certaines hypothèses sur le rôle des oléosines. On a notamment montré que l'absence de certaines oléosines implique une augmentation du taux de fusion. On a ainsi pu vérifier une hypothèse avancée par de nombreuses études. Ce résultat confirme notamment le fait que les oléosines ont une influence sur la stabilité des corps lipidiques et peuvent limiter la fusion. En revanche, il n'a pas été possible d'établir un lien entre l'abondance des oléosines et une augmentation du taux de fusion.

Les tests mis en place dans cette partie peuvent être utilisés pour vérifier d'autres hypothèses sur les oléosines à partir de jeux de données plus complets. Il serait notamment intéressant de vérifier si le taux de fusion a un lien avec la taille, la masse ou les propriétés physiques des oléosines (voir tableau 2.4). Il serait intéressant de savoir si des propriétés physiques comme l'hydrophobie des oléosines a un lien avec le taux de fusion et donc avec la capacité des oléosines à stabiliser les corps lipidiques.

Chapitre 6

Synthèse et conclusion

Contents

6.1 Modélisation du bourgeonnement des corps lipidiques 127
6.1.1 Synthèse des résultats 127
6.1.2 Perspectives 128
6.2 Détection d'événements de fusion 128
6.2.1 Synthèse des résultats 128
6.2.2 Perspectives 129
6.3 Modèle de la dynamique des corps lipidiques 129
6.3.1 Synthèse des résultats 129
6.3.2 perspectives 130
6.4 Apports pour la compréhension des corps lipidiques 130

Ce chapitre propose une synthèse des résultats présentés dans les chapitres précédents. Il propose aussi des perspectives de poursuite de ces travaux de thèse pour chacun des chapitres 3, 4 et 5. Enfin, un bilan des apports pour la compréhension de la biologie des corps lipidiques est donné ainsi que des perspectives d'utilisation des résultats obtenus.

6.1 Modélisation du bourgeonnement des corps lipidiques

6.1.1 Synthèse des résultats

Le chapitre 3 propose un modèle de bourgeonnement des corps lipidiques. Il présente un modèle des membranes entourant un corps lipidique en formation faisant intervenir la tension et la rigidité des membranes. Le modèle repose sur trois membranes : une bicouche isolant le cytosol du lumen du réticulum endoplasmique et deux monocouches entourant les lipides neutres. Une analyse des formes d'équilibres du modèle et de leur stabilité est donnée ainsi qu'une discussion sur l'influence des paramètres du modèle.

Le modèle prédit l'évolution d'une forme symétrique allongée vers une forme de sphère. La transition de la forme symétrique allongée à la forme sphérique repose sur l'instabilité de la forme allongée pour des petits volumes et une tension de la bicouche petite devant celle des monocouches.
Une différence de tension entre les deux monocouches conduit à des formes d'équilibres asymétriques et entraîne une directionnalité du bourgeonnement. L'asymétrie peut être expliquée par des différences de composition entre les deux monocouches ou par la présence de protéines entraînant des différences.

6.1.2 Perspectives

Le modèle prédit un bourgeonnement pour des formes d'un ordre de grandeur à la limite de la validité du modèle. Il serait donc intéressant de pouvoir confirmer ces résultats avec des modèles de types *coarse grained*.
La mise au point de modèle experimentaux *in vitro* permettrait aussi de confirmer les prédictions du modèle. De même, l'observation du bourgeonnement de corps lipidiques *in vivo* permettrait de valider les hypothèses du modèle.
Le développement d'un modèle de la formation de gouttes lipidiques à l'intérieur des membranes du réticulum endoplasmique permettrait de mieux comprendre la formation des corps lipidiques. Ce type de modèle peut permettre d'explorer la nucléation et la croissance des gouttes par coalescence ou par mûrissement d'Ostwald et peut permettre de mieux comprendre les rôles des protéines et l'importance de chaque mécanisme.

6.2 Détection d'événements de fusion

6.2.1 Synthèse des résultats

Le chapitre 4 présente la mise en place d'une procédure de détection d'événements de fusion à partir d'observation de corps lipidiques au cours du temps. Cette procédure comporte trois étapes : une étape de détection des corps lipidiques, une étape de suivi des corps lipidiques et une étape de détection des événements de fusion. La procédure de détection des événements de fusion repose sur l'utilisation de tests statistiques basés sur les volumes mesurés le long des trajectoires des corps lipidiques. La prise en compte de la variabilité des mesures de volume et l'utilisation de l'information des trajectoires permet d'améliorer la qualité de la détection. La procédure de détection des événements de fusion ne dépend pas des étapes de détection et de suivi et différents algorithmes peuvent être utilisés pour s'adapter aux caractéristiques des objets suivis.

L'application de cette procédure sur les images de corps lipidiques produit des résultats mitigés. En effet, beaucoup d'événements de fusion impliquent des objets situés sur les bords du champ d'observation, ce qui rend les mesures de volumes inutilisables. Cela suggère que la zone d'observation est trop petite. Il serait intéressant d'agrandir cette zone, notamment en profondeur pour pouvoir observer complètement un plus grand nombre d'objets. De nombreux objets "disparaissent" au cours de l'observation à cause du photo-blanchiment. Il serait intéressant de pouvoir réduire la puissance du laser afin de limiter ce phénomène et de corriger les éventuelles pertes de fluorescence a posteriori.

La procédure de détection des événements de fusion produit un grand nombre de faux positifs sur les données réelles mais permet cependant de réduire considérablement la recherche des événements de fusion. De plus, les événements de fusion détectés par inspection non automatique des images ont été correctement détectés par la procédure automatique. Il se peut cependant que certains événements de fusion aient été manqués par ces deux méthodes.

6.2.2 Perspectives

La procédure de détection mise en place peut sans grandes modifications être utilisés pour détecter des événements de fission de corps lipidiques à partir d'observation au cours du temps. Le principe de la procédure de détection peut être utilisée sur des images différentes pour détecter d'autres événements avec une loi de conservation (conservation de la surface, de l'intensité, etc).

Il serait intéressant de pouvoir intégrer la détection d'événements de fusion directement dans l'algorithme de suivi des objets. Les algorithmes de types tests multi-hypothèses sont particulièrement adaptés puisqu'ils se basent sur la construction de parties de trajectoires.

Le faible nombre d'événements de fusion détectés pour différents génotypes ne permet pas d'affirmer qu'il existe des différences dans la fusion des corps lipidiques entre ces génotypes. L'approche par modélisation, comme présentée dans le chapitre 5, peut en revanche permettre de comparer les taux de fusion et les informations apportés par l'intermédiaire de cette procédure de détection sont utiles pour appuyer les hypothèses de modélisation.

6.3 Modèle de la dynamique des corps lipidiques

6.3.1 Synthèse des résultats

Dans le chapitre 5, un modèle de la dynamique de fusion des corps lipidiques est proposé. Il repose sur un modèle de type champ moyen de l'évolution des distributions de volumes des corps lipidiques. Le modèle suppose notamment que le taux de fusion ne dépend pas du volume des corps lipidiques et suppose que l'évolution de la masse totale des corps lipidiques ne dépend pas de la présence des oléosines. Un estimateur du taux de fusion basé sur l'observation du volume de corps lipidiques à différents instants est ensuite étudié et utilisé pour comparer les taux de fusion de différents génotypes.

L'estimateur proposé est un estimateur des moments généralisés basé sur les moments de la solution de l'équation différentielle régissant l'évolution de la distribution de volume. Il utilise les observations à plusieurs instants et présente de bonnes propriétés asymptotiques. L'estimation des taux de fusion pour des observations sur le type sauvage et sur des types mutants n'exprimant pas certaines oléosines conduit à un bon ajustement des conditions sur les moments. Cela suggère que le modèle semble adapté pour décrire la dynamique d'évolution des corps lipidiques.
La comparaison des taux de fusion du type sauvage et des mutants indique que les mutants ont des taux de fusion plus élevés. Cela confirme que les oléosines influencent le

taux de fusion et permettent de stabiliser les corps lipidiques. En revanche, la comparaison des types mutants n'a pas permis d'établir de lien entre l'abondance des oléosines et l'augmentation du taux de fusion.

6.3.2 perspectives

Il serait intéressant de valider les résultats du modèle en utilisant par exemple d'autres jeux de données. Pour valider les hypothèses, il serait intéressant de pouvoir comparer les distributions de volumes observées et leur estimation. Il est donc nécessaire de développer un modèle de l'injection de nouveaux corps lipidiques. On pourra ainsi vérifier si les hypothèses sur le taux de fusion sont valables. On pourra aussi fournir un modèle de l'évolution de la taille moyenne des corps lipidiques.

La comparaison du taux de fusion chez tous les types de mutants en fonction de leurs propriétés physiques peut permettre de mieux comprendre le rôle des oléosines dans la fusion des corps lipidiques. En particulier, il serait intéressant d'explorer le lien entre le taux de fusion et l'hydrophobie, la taille ou la masse des oléosines.

6.4 Apports pour la compréhension des corps lipidiques

Ce travail a montré que le bourgeonnement des corps lipidiques peut être expliqué par la différence de tension entre les monocouches entourant les lipides neutres et la membrane du réticulum. Le modèle prédit un bourgeonnement des corps lipidiques autour de $20 - 100nm$. Ce bourgeonnement est spontané et ne nécessite pas d'apport d'énergie ou la présence de protéines spécifiques au bourgeonnement. Ce résultat suggère que les protéines du corps lipidique ont un rôle régulateur plutôt que moteur du bourgeonnement. Les protéines peuvent en effet moduler la tension effective des membranes et favoriser ou défavoriser le bourgeonnement. Le bourgeonnement peut aussi servir au recrutement de protéines en induisant une courbure de la membrane du réticulum endoplasmique qui peut être favorable à certaines protéines. L'observation des corps lipidiques en formation au niveau du réticulum endoplasmique par microscopie super-résolution peut permettre de confirmer ces résultats. En effet, la microscopie super-résolution peut permettre d'observer des détails à des ordres de grandeurs suffisants.
De nombreuses problématiques restent ouvertes notamment sur l'influence des protéines sur les autres phases de la formation des corps lipidiques. Celles-ci peuvent avoir un rôle dans la nucléation de gouttes ou bien dans la régulation de phénomènes comme la coalescence d'agrégats de lipides neutres ou le mûrissement d'Ostwald.

L'observation de corps lipidiques au cours du temps a permis de montrer que la fusion peut avoir lieu entre des corps lipidiques de même taille ou de tailles très différentes. En revanche, trop peu d'événements ont été observés et il n'a pas été possible de comparer le type sauvage à des types mutants n'exprimant pas certaines oléosines. Il serait intéressant de pouvoir comprendre l'influence des oléosines sur le taux de fusion en détectant un plus grand nombre d'événements. Une des possibilités d'amélioration consiste à corriger le photo-blanchiment et à agrandir le champ d'observation. Il est aussi possible d'observer

les corps lipidiques à des stades plus précoces, qui peuvent donner lieu à l'observation de plus d'événements.

Un modèle de la dynamique des distributions de taille des corps lipidiques a permis d'estimer les taux de fusion du type sauvage et de types mutants et les comparer. La comparaison du type sauvage aux mutants révèle que le taux de fusion est plus grand chez les mutants. Ce résultat confirme que les oléosines assurent la stabilité des corps lipidiques en limitant la fusion des corps lipidiques. Il serait intéressant de comparer les mutants entre eux afin de comprendre le rôle de chaque oléosine.

Les résultats de cette thèse peuvent être utilisées pour mettre au point un modèle complet de la formation et de la dynamique du stockage de l'huile végétale dans les graines de plantes.
Le modèle de l'évolution des distributions de taille peut être complété par un modèle de l'injection de nouveaux corps lipidiques. Il serait alors possible de calculer effectivement les distributions de taille des corps lipidique et leur évolution. La mise eu point d'un modèle complet de formation des corps lipidique, incluant la nucléation, la croissance et le bourgeonnement des corps lipidiques peut être utile pour étudier ce terme d'injection. Le couplage de ces modèles peut permettre d'obtenir un modèle global de la production et du stockage de lipides neutres. Le schéma de la figure 6.1 présente les différents aspects d'un tel modèle.

Ce type de modèle peut servir dans l'étude de l'extraction de l'huile végétale. Les sorties de ce modèle peuvent en effet servir dans des modèles d'extraction comme celui proposé dans [Campbell and Glatz, 2009]. La figure 6.2 donne une représentation schématique de ce type de modèle. L'estimation des taux de fusion et la compréhension du rôle des protéines proposé dans ce travail peuvent permettre d'affiner de tels modèles. Le couplage de ces modèles peut donner des pistes pour comprendre le rôle des oléosines et du stockage de l'huile végétale sur les rendements d'extraction.

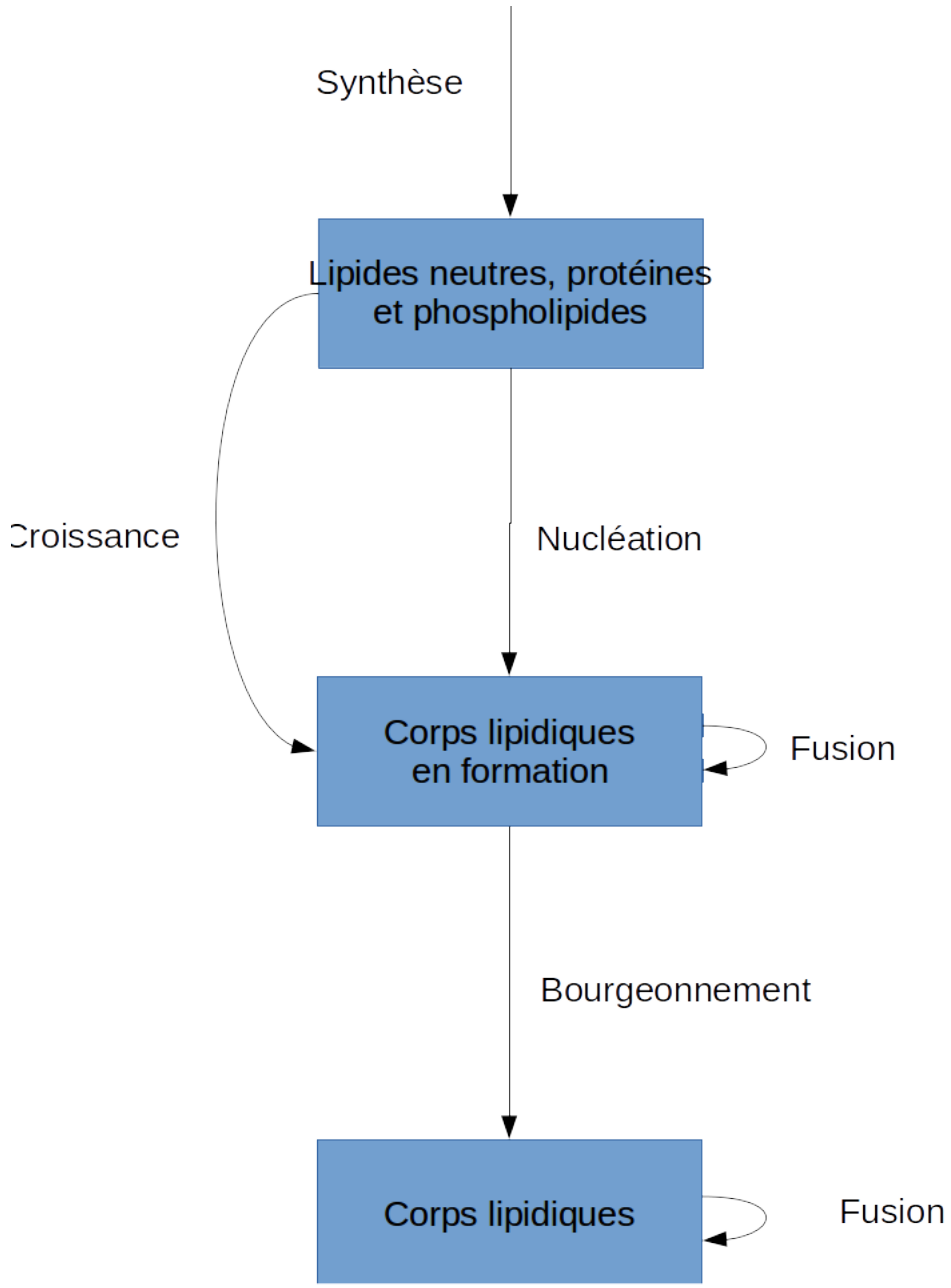


FIGURE 6.1 – Modèle global de la création des corps lipidiques. Dans ce modèle, les corps lipidiques peuvent se former par nucléation à partir de lipides neutres et de protéines. Ils grandissent ensuite par fusion ou par accumulation de lipides neutres puis bourgeonnent. Enfin, une fois formés et dans le cytoplasme, les corps lipidiques peuvent fusionner.

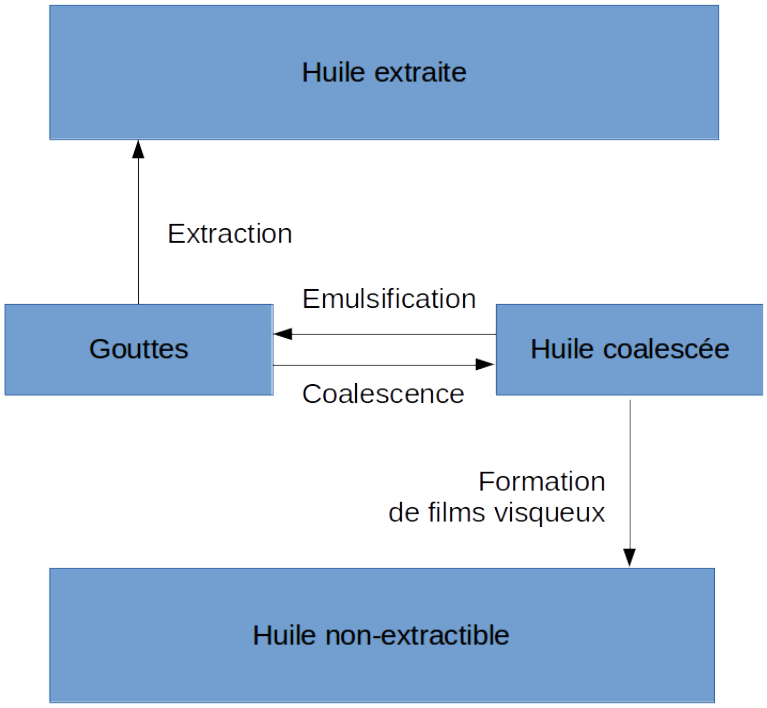


FIGURE 6.2 – Schéma de l'extraction de l'huile végétale. L'huile est extraite par pressage ou par l'utilisation de solvants qui détruisent la structure des cellules et libèrent les lipides neutres. Les corps lipidiques peuvent fusionner et devenir temporairement non-extractibles. Des mécanismes d'agitation permettent de reformer des gouttes par émulsification. Des films visqueux peuvent cependant se former autour de l'huile coalescée et empêcher sa récupération [Campbell and Glatz, 2009].

Bibliographie

[Ackleh, 1997] Ackleh, A. S. (1997). Parameter estimation in a structured algal coagulation-fragmentation model. *Nonlinear Analysis : Theory, Methods & Applications*, 28(5) :837–854.

[Aldous, 1999] Aldous, D. J. (1999). Deterministic and stochastic models for coalescence (aggregation and coagulation) : a review of the mean-field theory for probabilists. *Bernoulli*, pages 3–48.

[Armiento et al., 2016] Armiento, A., Doumic, M., Moireau, P., and Rezaei, H. (2016). Estimation from moments measurements for amyloid depolymerisation. *Journal of theoretical biology*, 397 :68–88.

[Bartz et al., 2007] Bartz, R., Li, W.-H., Venables, B., Zehmer, J. K., Roth, M. R., Welti, R., Anderson, R. G., Liu, P., and Chapman, K. D. (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *Journal of lipid research*, 48(4) :837–847.

[Baud et al., 2002] Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L., and Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in arabidopsis thaliana ecotype ws. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(2) :151 – 160.

[Blom and Bar-Shalom, 1988] Blom, H. A. and Bar-Shalom, Y. (1988). The interacting multiple model algorithm for systems with markovian switching coefficients. *Automatic Control, IEEE Transactions on*, 33(8) :780–783.

[Boschi et al., 2017] Boschi, F., Rizzatti, V., Zamboni, M., and Sbarbati, A. (2017). Simulating the dynamics of lipid droplets in adipocyte differentiation. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 138 :65 – 71.

[Boulard et al., 2015] Boulard, C., Bardet, M., Chardot, T., Dubreucq, B., Gromova, M., Guillermo, A., Miquel, M., Nesi, N., Yen-Nicolaÿ, S., and Jolivet, P. (2015). The structural organization of seed oil bodies could explain the contrasted oil extractability observed in two rapeseed genotypes. *Planta*, 242(1) :53–68.

[Bradley and Gart, 1962] Bradley, R. A. and Gart, J. J. (1962). The asymptotic properties of ml estimators when sampling from associated populations. *Biometrika*, 49(1/2) :205–214.

[Brasaemle, 2007] Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series : adipocyte biology. the perilipin family of structural lipid droplet proteins : stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research*, 48(12) :2547–2559.

[Brunel et al., 2015] Brunel, N. J., Clairon, Q., et al. (2015). A tracking approach to parameter estimation in linear ordinary differential equations. *Electronic Journal of Statistics*, 9(2) :2903–2949.

[Brunel et al., 2008] Brunel, N. J. et al. (2008). Parameter estimation of ode's via nonparametric estimators. *Electronic Journal of Statistics*, 2 :1242–1267.

[Campbell and Glatz, 2009] Campbell, K. and Glatz, C. E. (2009). Mechanisms of aqueous extraction of soybean oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22) :10904–10912.

[Canham, 1970] Canham, P. (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) :61 – 81.

[Capus et al., 2015] Capus, A., Monnerat, M., Ribeiro, L. C., de Souza, W., Martins, J. L., and Sant'Anna, C. (2015). Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource Technology*, pages –.

[Chakravorty and Challa, 2006] Chakravorty, R. and Challa, S. (2006). Augmented state integrated probabilistic data association smoothing for automatic track initiation in clutter. *J. Adv. Inf. Fusion*, 1(1) :63–74.

[Chenouard et al., 2009] Chenouard, N., Bloch, I., and Olivo-Marin, J.-C. (2009). Multiple hypothesis tracking in microscopy images. In *Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on*, pages 1346–1349. IEEE.

[Chenouard et al., 2014] Chenouard, N., Smal, I., De Chaumont, F., Maška, M., Sbalzarini, I. F., Gong, Y., Cardinale, J., Carthel, C., Coraluppi, S., Winter, M., et al. (2014). Objective comparison of particle tracking methods. *Nature methods*, 11(3) :281–289.

[Choudhary et al., 2015] Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., and Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the er. *J Cell Biol*, 211(2) :261–271.

[Colonna et al., 2015] Colonna, P., Tayeb, J., and Valceschini, E. (2015). Nouveaux usages des biomasses. *Le Déméter*, pages 275–305.

[Czabany et al., 2008] Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E., and Daum, G. (2008). Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25) :17065–17074.

[Daemen et al., 2015] Daemen, S., van Zandvoort, M. A., Parekh, S. H., and Hesselink, M. K. (2015). Microscopy tools for the investigation of intracellular lipid storage and dynamics. *Molecular Metabolism*.

[D'Andrea, 2015] D'Andrea, S. (2015). Lipid droplet mobilization : The different ways to loosen the purse strings. *Biochimie*, pages –.

[D'Andrea, 2016] D'Andrea, S. (2016). Lipid droplet mobilization : The different ways to loosen the purse strings. *Biochimie*, 120 :17–27.

[Dangeard, 1919] Dangeard, P. (1919). Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. *CR Acad. Sci.(Paris)*, 169 :1005–1010.

[Dangeard, 1922] Dangeard, P. (1922). Sur la structure de la cellule chez les iris. *CR Acad. Sci*, 175 :7–12.

[de Gennes et al., 2002] de Gennes, P., Brochard-Wyart, F., and Quéré, D. (2002). *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Collection Échelles. Belin.

[Demailly, 2017] Demailly, J.-P. (2017). Analyse numérique et équations différentielles.

[Deslandes et al., 2016] Deslandes, F., Laroche, B., and Trubuil, A. (2016). Fusion detection in time-lapse microscopy images : application to lipid droplets coalescence in plant seeds. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26) :239–244.

[Deslandes et al., 2017] Deslandes, F., Thiam, A. R., and Forêt, L. (2017). Lipid droplets can spontaneously bud off from a symmetric bilayer. *Biophysical Journal*, 113(1) :15–18.

[Dmitrieff and Nédélec, 2015] Dmitrieff, S. and Nédélec, F. (2015). Membrane mechanics of endocytosis in cells with turgor. *PLoS computational biology*, 11(10) :e1004538.

[Dubovskii and Stewart, 1996] Dubovskii, P. and Stewart, I. (1996). Existence, uniqueness and mass conservation for the coagulation-fragmentation equation. *Mathematical methods in the applied sciences*, 19(7) :571–591.

[Dubovskii, 1994] Dubovskii, P. B. (1994). *Mathematical theory of coagulation*. National Univ.

[D'Andréa et al., 2007] D'Andréa, S., Jolivet, P., Boulard, C., Larré, C., Froissard, M., and Chardot, T. (2007). Selective one-step extraction of arabidopsis thaliana seed oleosins using organic solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(24) :10008–10015.

[Elhai et al., 2016] Elhai, N., Duncan, R. W., and Stasolla, C. (2016). Molecular regulation of seed oil accumulation. *Journal of Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 2.

[Elliott and Songmu, 1986] Elliott, C. M. and Songmu, Z. (1986). On the cahn-hilliard equation. *Archive for Rational Mechanics and Analysis*, 96(4) :339–357.

[Farese and Walther, 2016] Farese, R. V. and Walther, T. C. (2016). Lipid droplets go nuclear. *The Journal of Cell Biology*, 212(1) :7–8.

[Foret, 2014] Foret, L. (2014). Shape and energy of a membrane bud induced by protein coats or viral protein assembly. *European Physical Journal E–Soft Matter*, 37(5).

[Foret et al., 2012] Foret, L., Dawson, J. E., Villaseñor, R., Collinet, C., Deutsch, A., Brusch, L., Zerial, M., Kalaidzidis, Y., and Jülicher, F. (2012). A general theoretical framework to infer endosomal network dynamics from quantitative image analysis. *Current biology*, 22(15) :1381–1390.

[Frandsen et al., 2001] Frandsen, G. I., Mundy, J., and Tzen, J. T. (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum*, 112(3) :301–307.

[Frey-Wyssling et al., 1963] Frey-Wyssling, A., Grieshaber, E., and Mühlethaler, K. (1963). Origin of spherosomes in plant cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 8(5) :506 – 516.

[Fujimoto and Parton, 2011] Fujimoto, T. and Parton, R. G. (2011). Not just fat : the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3) :a004838.

[Gao and Goodman, 2015] Gao, Q. and Goodman, J. M. (2015). The lipid droplet—a well-connected organelle. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3.

[Goold et al., 2015] Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets : composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports*, 34(4) :545–555.

[Graham, 2008] Graham, I. A. (2008). Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59 :115–142.

[Gugushvili et al., 2012] Gugushvili, S., Klaassen, C. A., et al. (2012). sqrt n-consistent parameter estimation for systems of ordinary differential equations : bypassing numerical integration via smoothing. *Bernoulli*, 18(3) :1061–1098.

[Guilliermond, 1923] Guilliermond, A. (1923). Sur les constituants morphologiques du cytoplasme de la cellule végétale. *Arch. Anat. Micr*, 20 :1–210.

[Gunstone, 2011] Gunstone, F. D. (2011). Supplies of vegetable oils for non-food purposes. *European journal of lipid science and technology*, 113(1) :3–7.

[Hansen, 1982] Hansen, L. P. (1982). Large sample properties of generalized method of moments estimators. *Econometrica : Journal of the Econometric Society*, pages 1029–1054.

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

[Huang, 1996] Huang, A. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology*, 110(4) :1055.

[Hurley et al., 2010] Hurley, J. H., Boura, E., Carlson, L.-A., and Różycki, B. (2010). Membrane budding. *Cell*, 143(6) :875–887.

[Jambunathan et al., 2011] Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y., and Puri, V. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS ONE*, 6(12) :e28614.

[Jaqaman et al., 2008] Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S. L., and Danuser, G. (2008). Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature methods*, 5(8) :695–702.

[Jolivet et al., 2004] Jolivet, P., Roux, E., d'Andrea, S., Davanture, M., Negroni, L., Zivy, M., and Chardot, T. (2004). Protein composition of oil bodies in arabidopsis thaliana ecotype ws. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6) :501–509.

[Jülicher and Seifert, 1994] Jülicher, F. and Seifert, U. (1994). Shape equations for axisymmetric vesicles : a clarification. *Physical Review E*, 49(5) :4728.

[Jüngst et al., 2013] Jüngst, C., Klein, M., and Zumbusch, A. (2013). Long-term live cell microscopy studies of lipid droplet fusion dynamics in adipocytes. *Journal of lipid research*, 54(12) :3419–3429.

[Kelly et al., 2013] Kelly, A. A., van Erp, H., Quettier, A.-L., Shaw, E., Menard, G., Kurup, S., and Eastmond, P. J. (2013). The sugar-dependent1 lipase limits triacylglycerol accumulation in vegetative tissues of arabidopsis. *Plant physiology*, 162(3) :1282–1289.

[Kim et al., 2002] Kim, H. U., Hsieh, K., Ratnayake, C., and Huang, A. H. (2002). A novel group of oleosins is present inside the pollen ofarabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25) :22677–22684.

[Kory et al., 2016] Kory, N., Jr, R. V. F., and Walther, T. C. (2016). Targeting fat : Mechanisms of protein localization to lipid droplets. *Trends in Cell Biology*, pages –.

[Kory et al., 2015] Kory, N., Thiam, A.-R., Jr., R. V. F., and Walther, T. C. (2015). Protein crowding is a determinant of lipid droplet protein composition. *Developmental Cell*, 34(3) :351 – 363.

[Kozlov and Chernomordik, 2015] Kozlov, M. M. and Chernomordik, L. V. (2015). Membrane tension and membrane fusion. *Current Opinion in Structural Biology*, 33 :61 – 67.

[Kuntam et al., 2015] Kuntam, S., Puskás, L. G., and Ayaydin, F. (2015). Characterization of a new class of blue-fluorescent lipid droplet markers for live-cell imaging in plants. *Plant cell reports*, 34(4) :655–665.

[Laibach et al., 2015] Laibach, N., Post, J., Twyman, R. M., Gronover, C. S., and Prüfer, D. (2015). The characteristics and potential applications of structural lipid droplet proteins in plants. *Journal of Biotechnology*, 201 :15 – 27. Molecular Biotechnology : from enzymes and metabolically engineered microbes to superior and sustainable products and processes.

[Leber et al., 1994] Leber, R., Zinser, E., Paltauf, F., Daum, G., and Zellnig, G. (1994). Characterization of lipid particles of the yeast, saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 10(11) :1421–1428.

[Lee et al., 2014] Lee, D., Huh, J.-Y., Jeong, D., Shin, J., Yun, A., and Kim, J. (2014). Physical, mathematical, and numerical derivations of the cahn–hilliard equation. *Computational Materials Science*, 81 :216–225.

[Legland et al., 2016] Legland, D., Arganda-Carreras, I., and Andrey, P. (2016). Morpholibj : integrated library and plugins for mathematical morphology with imagej. *Bioinformatics*, 32(22) :3532–3534.

[Li and Li, 2001] Li, N. and Li, N. (2001). Target perceivability and its applications. *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 49(11) :2588–2604.

[Lifshitz and Slyozov, 1961] Lifshitz, I. and Slyozov, V. (1961). The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 19(1–2) :35 – 50.

[Lin et al., 2002] Lin, L.-J., Tai, S. S., Peng, C.-C., and Tzen, J. T. (2002). Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. *Plant physiology*, 128(4) :1200–1211.

[Lipowsky, 2013] Lipowsky, R. (2013). Spontaneous tubulation of membranes and vesicles reveals membrane tension generated by spontaneous curvature. *Faraday discussions*, 161 :305–331.

[Lodish et al., 1995] Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology*, volume 3. Scientific American Books New York.

[Loer and Herman, 1993] Loer, D. S. and Herman, E. M. (1993). Cotranslational integration of soybean (glycine max) oil body membrane protein oleosin into microsomal membranes. *Plant physiology*, 101(3) :993–998.

[Long et al., 2012] Long, A. P., Manneschmidt, A. K., VerBrugge, B., Dortch, M. R., Minkin, S. C., Prater, K. E., Biggerstaff, J. P., Dunlap, J. R., and Dalhaimer, P. (2012). Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic*, 13(5) :705–714.

[Marrink and Tieleman, 2013] Marrink, S. J. and Tieleman, D. P. (2013). Perspective on the martini model. *Chemical Society Reviews*, 42(16) :6801–6822.

[McMahon and Gallop, 2005] McMahon, H. T. and Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068) :590–596.

[Meijering et al., 2009] Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I., and van Cappellen, W. A. (2009). Tracking in cell and developmental biology. *Seminars in Cell And Developmental Biology*, 20(8) :894 – 902. Imaging in Cell and Developmental Biology Planar Cell Polarity.

[Miquel et al., 2011] Miquel, M., Nesi, N., Paris, N., Larré, C., Quinsac, A., Savoire, R., Lanoisellé, J.-L., Jolivet, P., and Chardot, T. (2011). A continuum of research projects

to improve extraction of oil and proteins in oilseed plants. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(3) :168–172.

[Miquel et al., 2014] Miquel, M., Trigui, G., d'Andréa, S., Kelemen, Z., Baud, S., Berger, A., Deruyffelaere, C., Trubuil, A., Lepiniec, L., and Dubreucq, B. (2014). Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in arabidopsis seeds. *Plant physiology*, 164(4) :1866–1878.

[Miquel et al., 2015] Miquel, M., Trigui, G., Trubuil, A., and Dubreucq, B. (2015). Imaging and quantitative analysis of size and distribution of spherical bodies, eg embryonic oil bodies. *Bio-Protocole*, 5(1) :1–6.

[Miura, 2005] Miura, K. (2005). Tracking movement in cell biology. In *Microscopy Techniques*, pages 267–295. Springer.

[Morot-Gaudry, 2016] Morot-Gaudry, J.-F. (2016). *Les végétaux, un nouveau pétrole ?* Éditions Quae.

[Mukherji and O'Shea, 2014] Mukherji, S. and O'Shea, E. K. (2014). Mechanisms of organelle biogenesis govern stochastic fluctuations in organelle abundance. *Elife*, 3 :e02678.

[Murphy, 1993] Murphy, D. J. (1993). Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in lipid research*, 32(3) :247–280.

[Murphy, 2014] Murphy, D. J. (2014). Using modern plant breeding to improve the nutritional and technological qualities of oil crops. *OCL*, 21(6) :D607.

[Murphy et al., 2001] Murphy, D. J., Hernández-Pinzón, I., and Patel, K. (2001). Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *Journal of Plant Physiology*, 158(4) :471–478.

[Murphy and Vance, 1999] Murphy, D. J. and Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in biochemical sciences*, 24(3) :109–115.

[Ohsaki et al., 2016] Ohsaki, Y., Kawai, T., Yoshikawa, Y., Cheng, J., Jokitalo, E., and Fujimoto, T. (2016). Pml isoform ii plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J Cell Biol*, 212(1) :29–38.

[Paulsson, 2005] Paulsson, J. (2005). Models of stochastic gene expression. *Physics of life reviews*, 2(2) :157–175.

[Pego, 2007] Pego, R. L. (2007). Lectures on dynamics in models of coarsening and coagulation. *Dynamics in Models of Coarsening, Coagulation, Condensation, and Quantization, W. Bao and JG Liu eds,(Lect. Notes Ser. Inst. Math. Sci., Nat. Univ. Singapore) World Scientific*.

[Peng et al., 2003] Peng, C.-C., Lin, I., Lin, C.-K., Tzen, J. T., et al. (2003). Size and stability of reconstituted sesame oil bodies. *Biotechnology progress*, 19(5) :1623–1626.

[Phillips et al., 2005] Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with namd. *Journal of computational chemistry*, 26(16) :1781–1802.

[Pienkos and Darzins, 2009] Pienkos, P. T. and Darzins, A. (2009). The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(4) :431–440.

[Plimpton, 1995] Plimpton, S. (1995). Fast parallel algorithms for short-range molecular dynamics. *Journal of Computational Physics*, 117(1) :1 – 19.

[Ploegh, 2007] Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 448(7152) :435–438.

[Pol et al., 2014] Pol, A., Gross, S. P., and Parton, R. G. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet : Lipids, proteins, and sites. *The Journal of cell biology*, 204(5) :635–646.

[Pronk et al., 2013] Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., et al. (2013). Gromacs 4.5 : a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7) :845–854.

[Purkrtova et al., 2008] Purkrtova, Z., Jolivet, P., Miquel, M., and Chardot, T. (2008). Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10) :746 – 754. Les graines de la vie / The seeds of life.

[Qi and Zhao, 2010] Qi, X. and Zhao, H. (2010). Asymptotic efficiency and finite-sample properties of the generalized profiling estimation of parameters in ordinary differential equations. *The Annals of Statistics*, pages 435–481.

[Ramsay et al., 2007] Ramsay, J. O., Hooker, G., Campbell, D., and Cao, J. (2007). Parameter estimation for differential equations : a generalized smoothing approach. *Journal of the Royal Statistical Society : Series B (Statistical Methodology)*, 69(5) :741–796.

[Robenek et al., 2006] Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D., and Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the er membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of cell science*, 119(20) :4215–4224.

[Safran, 1994] Safran, S. A. (1994). *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes*, volume 90. Perseus Books.

[Schimmele and Dietrich, 2009] Schimmele, L. and Dietrich, S. (2009). Line tension and the shape of nanodroplets. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics*, 30(4) :427–430.

[Schumann, 1940] Schumann, T. (1940). Theoretical aspects of the size distribution of fog particles. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 66(285) :195–208.

[Seifert et al., 1991a] Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991a). Shape transformations of vesicles : Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Physical Review A*, 44(2) :1182.

[Seifert et al., 1991b] Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991b). Shape transformations of vesicles : Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Physical Review A*, 44(2) :1182.

[Shen et al., 2012] Shen, H., Pirruccello, M., and De Camilli, P. (2012). Snapshot : membrane curvature sensors and generators. *Cell*, 150(6).

[Shimada and Hara-Nishimura, 2010] Shimada, T. L. and Hara-Nishimura, I. (2010). Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(3) :360–363.

[Shimada and Hara-Nishimura, 2015] Shimada, T. L. and Hara-Nishimura, I. (2015). Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins. *Current Opinion in Plant Biology*, 25 :145 – 150.

[Shimada et al., 2008] Shimada, T. L., Shimada, T., Takahashi, H., Fukao, Y., and Hara-Nishimura, I. (2008). A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 55(5) :798–809.

[Siloto et al., 2006] Siloto, R. M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E. C., Nykiforuk, C. L., and Moloney, M. M. (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 18(8) :1961–1974.

[Soille, 2013] Soille, P. (2013). *Morphological image analysis : principles and applications*. Springer Science & Business Media.

[Stachowiak et al., 2013] Stachowiak, J. C., Brodsky, F. M., and Miller, E. A. (2013). A cost-benefit analysis of the physical mechanisms of membrane curvature. *Nature cell biology*, 15(9) :1019–1027.

[Tauchi-Sato et al., 2002] Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46) :44507–44512.

[Thazar-Poulot et al., 2015] Thazar-Poulot, N., Miquel, M., Fobis-Loisy, I., and Gaude, T. (2015). Peroxisome extensions deliver the arabidopsis sdp1 lipase to oil bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13) :4158–4163.

[Thiam et al., 2012] Thiam, A. R., Bremond, N., and Bibette, J. (2012). From stability to permeability of adhesive emulsion bilayers. *Langmuir*, 28(15) :6291–6298.

[Thiam et al., 2013] Thiam, A. R., Farese Jr, R. V., and Walther, T. C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12) :775–786.

[Thiam and Forêt, 2016] Thiam, A. R. and Forêt, L. (2016). The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, pages –.

[Tinevez et al., 2017] Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., and Eliceiri, K. W. (2017). Trackmate : An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115 :80 – 90. Image Processing for Biologists.

[Trigui, 2014] Trigui, G. (2014). *Dynamique des corps lipidiques dans la graine d'Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI.

[Trigui et al., 2012] Trigui, G., Laroche, B., Miquel, M., Dubreucq, B., and Trubuil, A. (2012). The dynamics of oil bodies in arabidopsis thaliana seeds : a mathematical model of biogenesis and coalescence. *World Academy of Science, Engineering and Technology (64), 763-768.(2012).*

[Tzen et al., 1992] Tzen, J., Lie, G., and Huang, A. (1992). Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22) :15626–15634.

[Tzen et al., 1993] Tzen, J. T., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., and Huang, A. H. (1993). Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant physiology*, 101(1) :267–276.

[Venables and Ripley, 2013] Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2013). *Modern applied statistics with S-PLUS*. Springer Science & Business Media.

[Vindigni, 2011] Vindigni, J.-D. (2011). *Solubilisation des olséosines de graines d'Arabidopsis thaliana, études structurales pour la valorisation*. PhD thesis, AgroParisTech.

[von Hanstein, 1880] von Hanstein, J. L. E. R. (1880). *Einige Züge aus der Biologie des Protoplasmas*. Marcus.

[Von Smoluchowski, 1917] Von Smoluchowski, M. (1917). Investigation of a mathematical theory on the coagulation of colloidal suspensions. *Z. Physik. Chem*, 92 :129–168.

[Wagner, 1961] Wagner, C. (1961). Theorie der alterung von niederschlägen durch umlösen (ostwald-reifung). *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 65(7-8) :581–591.

[Walther and Farese Jr, 2009] Walther, T. C. and Farese Jr, R. V. (2009). The life of lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6) :459–466.

[Walther and Farese Jr, 2012] Walther, T. C. and Farese Jr, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual review of biochemistry*, 81 :687.

[Wattis, 2006] Wattis, J. A. (2006). An introduction to mathematical models of coagulation–fragmentation processes : a discrete deterministic mean-field approach. *Physica D : Nonlinear Phenomena*, 222(1) :1–20.

[Welte, 2015] Welte, M. A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Current Biology*, 25(11) :R470 – R481.

[Whitesides and Ross, 1995] Whitesides, T. H. and Ross, D. S. (1995). Experimental and theoretical analysis of the limited coalescence process : stepwise limited coalescence. *Journal of colloid and interface science*, 169(1) :48–59.

[Wilfling et al., 2013] Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J.-X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., et al. (2013). Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the er to lipid droplets. *Developmental cell*, 24(4) :384–399.

[Yatsu and Jacks, 1972] Yatsu, L. and Jacks, T. (1972). Spherosome membranes half unit-membranes. *Plant physiology*, 49(6) :937–943.

[Yatsu et al., 1971] Yatsu, L., Jacks, T., and Hensarling, T. (1971). Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage, and cottonseed tissues. *Plant physiology*, 48(6) :675–682.

[Young, 1805] Young, T. (1805). An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 95 :65–87.

[Zanghellini et al., 2010] Zanghellini, J., Wodlei, F., and von Grünberg, H. (2010). Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3) :952 – 961.

[Zhao et al., 2015] Zhao, Y.-Y., Miao, H., Cheng, X.-L., and Wei, F. (2015). Lipidomics : Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease. *Chemico-biological interactions*, 240 :220–238.

[Zimmerberg and Kozlov, 2006] Zimmerberg, J. and Kozlov, M. M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(1) :9–19.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Modélisation de la dynamique des corps lipidiques chez *Arabidopsis thaliana*

Mots clés : Corps lipidiques, analyse d'image, modélisation, biophysique

Résumé : L'objectif du projet de thèse est de décortiquer les mécanismes responsables du phénotype des corps lipidiques à l'échelle cellulaire et à l'échelle de la graine. Dans un premier temps, l'étude d'un modèle de la forme de gouttes lipidiques situées entre les deux feuillets d'une bicouche lipidique revèle l'existence d'un volume critique au delà duquel une transition spontanée d'une forme symétrique allongée vers une forme sphérique a lieu. Une étude de ce mécanisme de bourgeonnement est donnée et apporte un éclairage sur la formation des corps lipidiques. La segmentation de corps lipidiques dans des images de microscopie confocale et leur suivi temporel permet de détecter des événements de fusion entre corps lipidiques. Une méthode basée sur l'hypothèse de conservation du volume permet de détecter ces événements à partir des mesures de volumes des corps lipidiques le long des trajectoires pour plusieurs embryons d'A. thaliana. Enfin, un modèle de coalescence des corps lipidiques au cours du développement de jeunes embyrons d'A. thaliana est développé. Les taux de fusion de ce modèle sont estimés et comparés pour plusieurs embryons, sauvage et mutants d'oléosines, à partir de mesures de volumes de corps lipidiques issues d'images à plusieurs stades de développement.

Title : Modeling the dynamics of oil bodies in *Arabidopsis thaliana*

Keywords : Oil bodies, image analysis, modeling, biophysics

Abstract : The aim of the PhD project is to dissect the mechanisms involved in the phenotype of lipid droplets both at the cellular level and the seed level. Studying a model of a lipid droplet embedded in the leaflets of a lipid bilayer reveals the existence of a critical volume at which the shape of the droplet breaks from a symmetrical elongated lens to a spherical protrusion. This budding mechanisms provides new insights in the formation of lipid droplets. Segmentation and tracking of lipid droplets from timelapse confocal microscopy images allows the detection of lipid droplets fusion events. A method based on the conservation of volume during the fusion event is developed and applied to detect fusion events for several embryos of A. thaliana. A model of the coalescence of lipid droplets during the development of early A. thaliana embryos is developed. The fusion rate is estimated and compared in different wild type and mutant embryos. The estimation is based on lipid droplets volumes measured from images at different stages of the development of the embryos.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France