



HAL
open science

Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des entérocytes : étude par FRAP à deux photons

François Waharte

► **To cite this version:**

François Waharte. Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des entérocytes : étude par FRAP à deux photons. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2002. Français. NNT: . tel-00001871

HAL Id: tel-00001871

<https://theses.hal.science/tel-00001871>

Submitted on 8 Nov 2002

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.

Thèse de doctorat de l'Université Paris XI - Orsay

Spécialité : Physique des Liquides

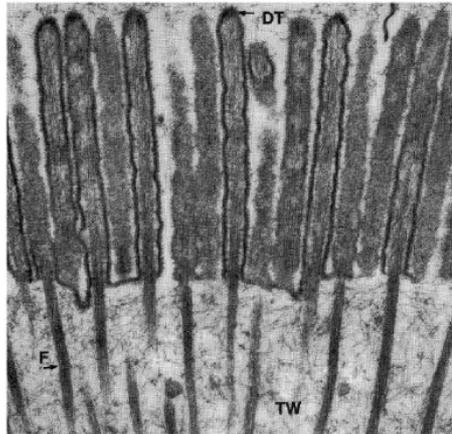
Présentée par

François Waharte

Pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences de l'Université Paris XI

Sujet :

Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des entérocytes : Etude par FRAP à deux photons.



Soutenue le 22 juillet 2002 devant le jury composé de :

M.	François	Amblard	Directeur de thèse
Mme	Evelyne	Coudrier	Examinateur
M.	Bertrand	Fourcade	Rapporteur
Mme	Nancy	Guillén-Aghion	Rapporteur
M.	Jan	De Mey	Président du jury
Mme	Brigitte	Pansu	Examinateur
M.	Jacques	Prost	Examinateur

La seule vraie science est la connaissance des faits.

Buffon, Histoire Naturelle.

Cette thèse s'est déroulée au laboratoire *Physico-Chimie Curie* (UMR 168) et au laboratoire *Morphogenèse et Signalisation Cellulaires* (UMR 144) à l'Institut Curie sous la direction de François Amblard et Jacques Prost pour la Physique, et Evelyne Coudrier pour la Biologie. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger le travail d'un physicien s'intéressant à un problème de biologie cellulaire. Ce fut un grand plaisir pour moi de réunir des scientifiques d'horizons variés pour avoir une discussion sur des intérêts communs. Je remercie donc Jan De Mey d'avoir présidé le jury, Nancy Guillén-Aghion et Bertrand Fourcade d'avoir été les rapporteurs de ma thèse et d'avoir lu si scrupuleusement ce mémoire. Je remercie également Brigitte Pansu de s'être intéressée à ce sujet plutôt éloigné de son domaine habituel et d'avoir représenté, avec Jan De Mey, l'Université Paris XI.

Le premier instigateur de ce travail a été Jacques Prost qui a réussi à me convaincre de laisser un peu de côté mes équations préférées pour me lancer dans l'expérimentation. Qu'il soit grandement remercié de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir ouvert les portes de ce domaine émergent et prometteur, l'interface Physique-Biologie, en m'accueillant dans son laboratoire lors de mon DEA.

Je remercie vivement François Amblard d'avoir encadré ma thèse depuis l'ESPCI d'abord, puis au laboratoire par la suite, et de m'avoir transmis (entre autres choses !) un peu de son sens de la débrouillardise, bien utile pour résoudre les nombreux problèmes techniques rencontrés lors de ce travail ! Merci de m'avoir formé à l'expérimentation et à l'instrumentation, et pour ton enthousiasme constant !

Merci à Patricia Bassereau qui m'a encadré lors de la première année de thèse et qui m'a aidé à passer de l'étage des théoriciens à celui des expérimentateurs !

Je tiens à remercier également Claire Brown, postdoctorante canadienne dans notre équipe, pour les heures passées ensemble pour tenter de faire fonctionner la manip et pour sa grande gentillesse. It was really nice to work with someone like you, Claire !

Sylvie Coscoy, également postdoctorante dans notre équipe, mérite ma plus grande gratitude pour son aide, ses remises en cause constantes et les nombreuses heures à discuter de l'analyse des données et de leur interprétation, ou d'autres sujets !

Je remercie l'ensemble des chercheurs du laboratoire, qu'ils soient physiciens ou chimistes, et en particulier : Albrecht Ott (pour le prêt régulier de matériel et les conseils avisés), Jean-Louis Viovy, Cécile Sykes, Emmanuel Farge, Othman Bouloussa (merci pour nous avoir fait partager ta culture et tes plats délicieux !).

De part son côté pluridisciplinaire, une part importante de cette thèse s'est déroulée dans l'équipe de biologistes dirigée par Daniel Louvard au sein de l'UMR 144, et je le remercie de son accueil et de son soutien.

Evelyne Coudrier a eu la difficile tâche de m'encadrer pour l'aspect biologique de cette thèse et elle a su m'initier efficacement à la biologie cellulaire. Un grand merci pour ta patience, ta rigueur et tes explications toujours très claires et adaptées à un simple physicien !

Merci à toute l'équipe du laboratoire pour son accueil, son aide, et sa patience envers un physicien souvent un peu perdu dans le monde de la Biologie. En particulier, je tiens à remercier chaleureusement Monique Harpin, Sylvie Robine, Ahmed Zahraoui, Thierry Galli, Evelyne Friedrich, Roy Goldsteyn, Marie-Neige Cordonnier (dont les articles vont sans aucun doute contribuer à élever le niveau scientifique et culturel de la population française !), Marion Chabrilat, Julie Fradelizi (dont les illustrations valent le détour !), Bernadette Menichi, Rafika Athman (dont il faut aller écouter les exposés oraux !), Daniel Pinto, Patrick Poulet, Alexis Gautreau, Anne-Marie Marzesco et Julie Plastino (experte reconnue en cookies !).

Cette thèse n'aurait pas été la même sans les étudiants, passés ou présents, de l'UMR 168 dont le dynamisme, la sympathie et la solidarité apportent une ambiance de travail très agréable. En particulier, je tiens à remercier :

- Andrea Parmeggiani, théoricien italien, qui a été mon premier contact au labo et en qui j'ai trouvé un ami et un professeur d'italien. Travailleur acharné et bavard invétéré, discuter avec lui est toujours très instructif. Grazie tanto per la tua amicizia...e Forza Italia !
- Vincent Noireaux, co-mutant, avec qui j'ai eu de passionnantes discussions (scientifiques ou moins scientifiques !), et qui m'a aidé de nombreuses fois. Merci pour ton amitié et ta sagesse !
- Jean-Baptiste Manneville, expert en micropipettes et vésicules, qui m'a accueilli dans son bureau et avec qui j'ai eu plaisir à partager le mac. Merci pour ta gentillesse et ton dynamisme !
- Olivia du Roure, AFM Woman, dont le soutien moral infatigable m'a aidé à tenir bon jusqu'à la fin de la thèse. Merci pour ton écoute et ton amitié !
- Sébastien Camalet, théoricien n'ayant pas peur des reconversions difficiles, qui est une des rares personnes au labo à pouvoir me faire parler pendant des heures. Merci pour ta sympathie et ton intelligence !
- Etienne Huguet, ami biphotoniste, pour nos discussions variées, son soutien jusqu'au derniers moments de ma thèse, son amitié...et les ramassages de châtaignes ! Bravo pour ta perspicacité et ta persévérance !
- Loïc LeGoff, spécialiste de l'actine, vieux camarade de bataille qui malgré le raccourcissement important de ses cheveux reste toujours aussi sympathique ! Bonne chance dans le Nouveau Monde !
- Flore Barcellini, nouvelle arrivée dans l'équipe, mais qui a vite pris une place importante dans la vie du troisième étage, notamment grâce à sa grande collection de blagues ! Merci pour nos discussions et ta gentillesse !
- Pierre-Henry "t'as pas un peu de GFP ?" Puech, dont l'esprit affuté lui permet d'être au courant de tout ! Merci pour ton soutien moral et ta sympathie !

- Arnaud Martin, physicien reconverti en philosophe, dont la simplicité et le calme sont précieux. Que la Force soit avec toi !
- Cyril Rauch, autre physicien à l'interface physique-biologie, et ancien camarade de DEA, qui m'a appris pas mal de choses en biologie et en cancérologie.
- Manuel Sickert, ancien thésard Allemand et acteur de longs métrages à ses moments perdus, pour sa bonne humeur constante et son amitié. Viel Glück für deine Leben mein Freund !
- Olivier Sandre, physico-chimiste appliqué, dont le calme, l'efficacité et la gentillesse sont exemplaires !
- Eric Brouzès, expert ès drosophiles, avec qui j'ai toujours eu plaisir à discuter et manger à la cantine (l'un des seuls thésards à manger à mon rythme !).
- Claus Fuetterer, postdoc Allemand capable de construire un microscope avec trois fois rien, avec qui j'ai toujours des échanges très intéressants et amicaux.

mais aussi : Mathilde Badoual, Olivier Rossier, Hakim Boukellal, Jacques Pécreaux, Cécile Leduc, Ewa Paluch, Sophia Magnusdotir,...La liste serait trop longue pour tous les citer, que ceux que je n'ai pas cité ici ne m'en tiennent pas trop rigueur !

Je remercie très chaleureusement l'équipe de Serge Charpak à l'ESPCI qui ont partagé la pièce du deux-photons et le laser avec moi. En particulier, merci à Serge Charpak, Jérôme Mertz (pour ses conseils très pertinents et la clarté de ses explications), Emmanuel Beaurepaire (pour ses talents de programmeur) et (last but not least !) Laurent Moreaux, pour leur aide et leur sympathie. Merci Laurent pour toutes tes explications en optique et les moments passés ensemble autour du laser !

Merci également à : Patrick Suchet, Jean-Hugues Codarbox (pour l'électronique et la musique !), le secrétariat et l'administration des salles sans qui la thèse n'aurait tout simplement pas pu se faire ! Un merci particulier à l'atelier de Mécanique, Jean-Pierre Pencilé, Gilles Rousseau et, en particulier, Michel Petit pour toutes les pièces indispensables à la manip et pour m'avoir appris à me servir d'une perceuse à colonne, d'un tour ou d'une fraiseuse ! Merci Michel pour ta gentillesse et ton aide constante lors de ma thèse !

Je tiens à remercier spécialement Stéphane Tsacas, Mohammed Zitoun, Jean-Gabriel Dick, François-David Collin et Mansour Diop-Dusseaux, l'équipe informatique, pour m'avoir souvent sauvé d'un mauvais pas, mais également pour m'avoir fait l'honneur de partager mon repas pendant une bonne partie de la thèse tout en m'apprenant de nouveaux mots comme «routeur», «backbone» ou encore DHCP. Merci les gars pour votre bonne humeur et les franches rigolades !

Merci à tous ceux et toutes celles (collègues, amis et famille) qui m'ont aidé pour le pot de thèse, me permettant de finir ainsi dans la gaieté cette période importante de ma vie.

Enfin, je remercie l'Association pour la Recherche contre le Cancer pour son soutien financier lors de la dernière année de thèse.

Table des matières

Avant propos	i
Partie I Introduction	1
I.1 Contexte biologique	3
I.1.1 L'épithélium intestinal	3
I.1.1.1 L'intestin	3
Anatomie de l'épithélium	3
Physiologie de la digestion et absorption	5
I.1.1.2 Les entérocytes	8
La polarité cellulaire	8
La bordure en brosse	9
I.1.2 Dynamique de la bordure en brosse à l'état stationnaire	14
I.1.2.1 Vers une connaissance de la dynamique de la bordure en brosse	14
I.1.2.2 Dynamique du cytosquelette d'actine	14
Dynamique de polymérisation de l'actine <i>in vitro</i>	14
Dynamique et rôle de l'actine dans les cellules	16
I.1.2.3 La myosine I de la bordure en brosse	18
Les myosines I	18
Structure de BBMI	21
Cinétique de l'activité ATPase	23
Interaction avec les membranes lipidiques	23
Régulation de l'activité <i>in vitro</i>	24
Rôle de BBMI dans les cellules	27

I.2	Objectifs de cette étude	29
I.3	Principes physiques et méthodes expérimentales	31
I.3.1	La microscopie à deux photons	32
I.3.1.1	La fluorescence en excitation à deux photons	32
	Rappel sur la fluorescence classique	32
	L'excitation à deux photons	34
I.3.1.2	Principe d'un microscope à deux photons	37
	Imagerie	37
	Localisation de l'excitation	37
	Profil d'excitation : PSF	39
	Résolution	40
	Collecte de la fluorescence	40
I.3.1.3	Avantages et applications	40
	Comparaison avec la microscopie confocale	41
	Utilisation en biologie	42
I.3.2	La technique de FRAP	43
I.3.2.1	Le photoblanchiment	43
I.3.2.2	Principe de la méthode	44
I.3.2.3	Hypothèses et exploitation théorique	45
	Cas diffusif	46
	Cas convectif	47
	Cas diffusif et convectif	47
	Distinction diffusion/convection	48
I.3.2.4	Limitations de la technique	49
	Le photoblanchiment réversible	50
I.3.2.5	Applications biologiques	51
I.3.3	La FRAP en excitation à deux photons	51
I.3.3.1	Principe	51
I.3.3.2	Interprétation des expériences	52
I.3.3.3	Photoblanchiment à deux photons	52

Partie II	Système expérimental	55
II.1	Modèle biologique	57
II.1.1	Choix du fluorophore	57
II.1.1.1	Les différents mutants de la Green Fluorescent Protein (GFP)	57
II.1.1.2	Comparaison entre EGFP et GFPuv	58
II.1.2	Modèle cellulaire	60
II.1.2.1	Les cellules Caco-2	60
II.1.2.2	Distribution des protéines du cytosquelette dans les cellules utilisées	62
II.1.2.3	Mesure de la hauteur de la bordure en brosse des cellules Caco-2	63
II.2	Dispositif expérimental	67
II.2.1	Le microscope à deux photons	67
II.2.1.1	Matériel utilisé	67
	Principe du montage	67
	Description du montage	68
II.2.1.2	Logiciel d'acquisition	73
II.2.2	Montage expérimental pour la FRAP	73
II.2.2.1	Matériel spécifique pour la FRAP	74
	Principe	74
	Description du montage	74
II.2.2.2	Logiciel dédié à la FRAP	78
	Principe du programme	78
	Synchronisation entrées/sorties	79
II.2.3	Caractérisation de l'instrument	79
II.2.3.1	Réponse du modulateur électro-optique	80
	Réponse statique	80
	Réponse dynamique	81
II.2.3.2	Réponse des photomultiplicateurs	81
	Réponse statique	81
	Réponse dynamique	82
II.2.3.3	Correction de la réponse du modulateur	83

II.2.3.4	Détermination de la réponse impulsionnelle spatiale (PSF)	85
II.2.3.5	Limitations et améliorations	87
Pertes par réflexion		87
Amélioration du rapport signal sur bruit		87
II.3	Déroulement des expériences	89
II.3.1	Réglage de l'instrument	89
II.3.1.1	Calibration de la puissance	89
II.3.1.2	Choix des paramètres d'acquisition	89
II.3.2	Traitement des données brutes	89
II.3.2.1	Correction des données	90
II.3.2.2	Normalisation et représentation graphique	91
Partie III	Résultats	93
III.1	Analyse théorique des expériences de FRAP	95
III.1.1	Modélisation du système	95
III.1.1.1	Limitations des modèles existants	95
Modèle Axelrod (1976)		95
Modèle Brown (1999)		95
Critique des hypothèses		96
III.1.1.2	Géométrie du système	97
III.1.1.3	Modélisation du photoblanchiment	97
III.1.1.4	Dynamique des molécules	99
III.1.1.5	Calcul numérique	100
III.1.1.6	Simulation des expériences de FRAP	101
III.1.2	Caractérisation des conditions expérimentales	102
III.1.2.1	Effet de la durée de la phase de photoblanchiment	103
Mise en évidence expérimentale		103
Déplétion en concentration		105
La remontée de fluorescence dépend de T_p		106
III.1.2.2	Effet du photoblanchiment observationnel	108

III.1.3	Ajustement des courbes expérimentales	110
III.2	Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse	113
III.2.1	BBMI-GFP a une activité motrice dans la bordure en brosse	113
III.2.1.1	Le mouvement de BBMI-GFP est ATP-dépendant	115
III.2.1.2	Effet d'un inhibiteur de l'activité ATPase sur le mouvement de BBMI-GFP	116
III.2.1.3	Rôle du domaine moteur dans le mouvement de BBMI-GFP	117
III.2.2	BBMI-GFP et l'actine-GFP ont une dynamique différente	119
III.2.3	Effet d'un agent stabilisateur de l'actine sur la mobilité des protéines	120
III.2.3.1	Effet sur l'actine-GFP	121
III.2.3.2	Effet sur BBMI-GFP et BBMI Δ 730-GFP	121
III.2.4	Mobilité des protéines à la membrane latérale	123
III.2.4.1	BBMI-GFP	123
III.2.4.2	BBMI Δ 730-GFP	124
III.2.4.3	Actine-GFP	126
Partie IV	Discussion	129

Avant propos

L'intestin est le lieu de nombreux échanges entre les aliments ou les produits pharmaceutiques et l'organisme. Il possède une structure parfaitement adaptée à cette fonction, dont l'ultime spécialisation est constituée par la bordure en brosse des entérocytes. En effet, les cellules épithéliales de l'intestin possèdent une membrane plasmique très structurée, appelée bordure en brosse, qui est formée de petites extensions ou microvillosités, et se trouve au pôle apical des cellules (c'est-à-dire, dans ce contexte, du côté de la cavité intestinale). Elle est le siège de nombreux phénomènes de transport entre la lumière de l'intestin et l'organisme, ce qui en fait un modèle très riche pour l'étude de la dynamique du cytosquelette et de la membrane plasmique, dynamique encore très peu connue. De plus, le maintien de la structure même de la bordure en brosse et sa faculté d'adaptation aux variations des conditions physiologiques de l'intestin supposent une réorganisation continue du cytosquelette et de la membrane plasmique.

Les principaux candidats pour assurer ce maintien sont l'actine et une protéine motrice, la myosine I des bordures en brosse (*BBMI : Brush Border Myosin I*). En effet, les microvillosités sont constituées principalement d'un faisceau de filaments d'actine liés entre eux par plusieurs protéines et reliés à la membrane par BBMI. De plus, l'actine est connue pour intervenir dans de nombreux phénomènes dynamiques en liaison avec les modifications morphologiques des cellules. BBMI, dont le rôle n'est pas connu et dont les propriétés *in vivo* ont été très peu étudiées, pourrait également apporter sa contribution en tant que moteur moléculaire, capable éventuellement d'exercer une force entre l'actine et la membrane plasmique.

Le but de cette thèse, qui se situe à l'interface entre la physique et la biologie cellulaire, est de mesurer la dynamique de ces deux protéines *in vivo* dans la bordure en brosse, et de tenter de comprendre leur rôle dans cette région de la cellule. En particulier, nous nous proposons de savoir si BBMI est mobile ou non dans les microvillosités, ce qui n'a encore jamais été observé. Nous souhaitons également étudier son éventuelle activité motrice, seulement mesurée *in vitro* jusqu'à présent. Enfin, nous explorerons une possible corrélation entre la dynamique de l'actine et celle de BBMI.

Pour ces expériences, nous avons développé un instrument spécifiquement dédié à la mesure locale de la mobilité des protéines dans les cellules vivantes par la combinaison de la technique classique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) et de la microscopie à deux photons. Notre travail est le premier à utiliser cette technique récente pour étudier un problème

biologique.

Nous verrons donc dans une première partie dans quel contexte biologique se place notre travail et nous détaillerons les propriétés connues de l'actine et de BBMI. La deuxième moitié de cette partie sera consacrée à la présentation des techniques physiques utilisées pour mener à bien nos expériences, c'est-à-dire la microscopie à deux photons et la technique de FRAP.

La seconde partie de ce mémoire décrit le modèle biologique utilisé dans notre étude, ainsi que le dispositif expérimental. L'instrument sera décrit assez en détail étant donné sa nouveauté.

Les résultats obtenus avec notre instrument seront présentés dans une troisième partie. Celle-ci débutera par l'exposé de la modélisation théorique des expériences que nous avons utilisé pour interpréter nos résultats.

Enfin, nous discuterons la validité des résultats et leur interprétation dans une quatrième et dernière partie. Nous verrons également quelles expériences peuvent être envisagées pour compléter cette étude.

Première partie

Introduction

Chapitre I.1

Contexte biologique

Dans ce chapitre, nous allons présenter le système biologique étudié, la bordure en brosse des entérocytes, en le replaçant dans le contexte plus général de l'épithélium intestinal et de sa physiologie. Nous détaillerons ensuite les particularités des entérocytes et la structure de la bordure en brosse. Enfin, nous aborderons la bordure en brosse non plus d'un point de vue statique, mais sous un angle dynamique, en mettant en valeur les principaux acteurs susceptibles d'intervenir dans cette dynamique, à savoir l'actine et la myosine I de la bordure en brosse, qui sont au cœur de notre étude.

I.1.1 L'épithélium intestinal

Afin de mieux comprendre l'importance de l'étude des phénomènes de transport ayant lieu au niveau de la muqueuse intestinale, et donc la portée de ce travail de thèse, nous allons voir dans cette première section, la structure de l'intestin humain et son fonctionnement lors de la digestion et de l'absorption des aliments. En effet, l'intestin joue un rôle fondamental dans la digestion des aliments et leur assimilation par l'organisme. C'est là que se produisent les dernières étapes de la digestion et l'essentiel de l'absorption des nutriments (glucides, protéides et lipides). L'accomplissement de ces fonctions implique une structure particulière, très spécifique de l'intestin, dont l'élément ultime est la bordure en brosse des entérocytes que nous décrirons également.

I.1.1.1 L'intestin

Anatomie de l'épithélium

Afin d'augmenter l'efficacité d'assimilation des nutriments, la structure de l'intestin offre une surface d'échange maximale entre les aliments se trouvant dans la lumière intestinale (c'est-à-dire la cavité du tube digestif) et l'épithélium tapissant sa paroi. On distingue trois

niveaux d'organisation de la muqueuse intestinale :

- les plis circulaires transversaux de 1 cm de haut (valvules conniventes) ;
- les villosités intestinales de 0.5 à 1 mm de haut ;
- les microvillosités de la bordure en brosse¹ des entérocytes de 1 à 2 μm de haut.

Ces trois niveaux de spécialisation et leur imbrication sont schématisés sur la figure I.1.1. On estime que la combinaison de ces trois structures augmente environ 600 fois la surface de l'intestin grêle par rapport à un tube lisse, portant la surface totale de cette partie de l'intestin à environ 200-300 m².

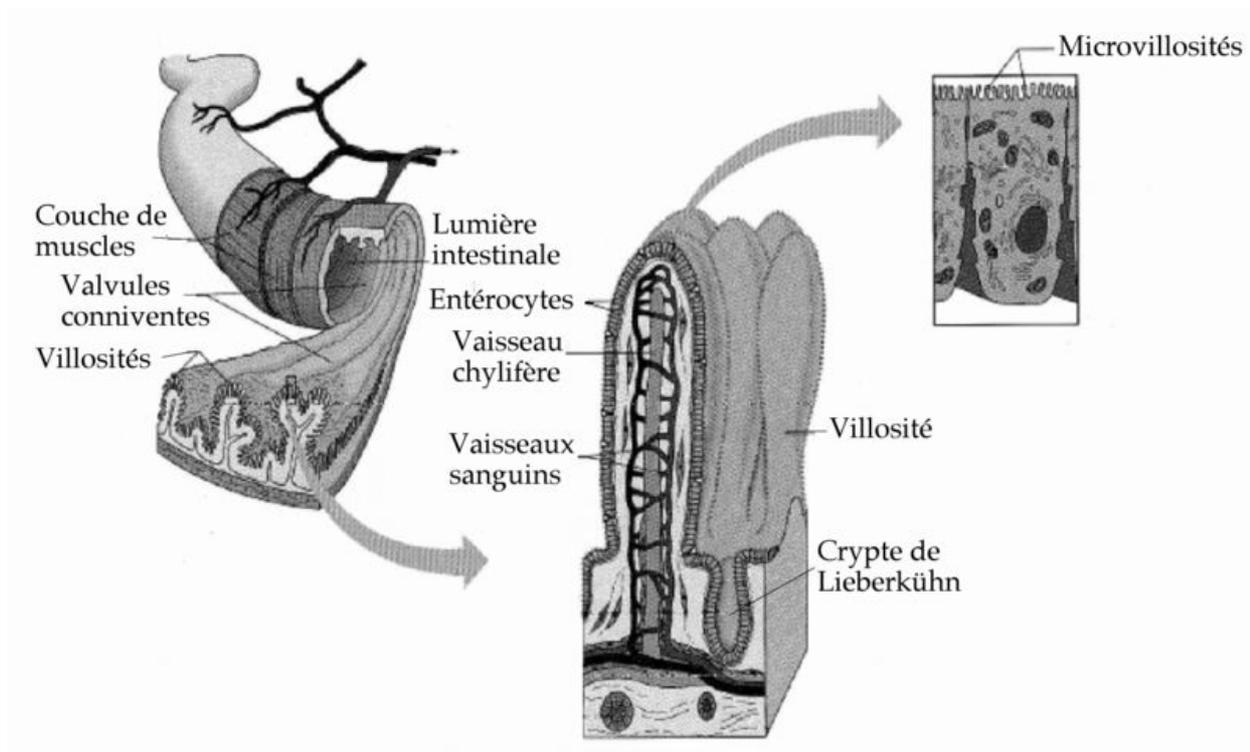


FIG. I.1.1: **Structure de l'épithélium intestinal humain** (D'après [Marieb, 1999]). On voit l'imbrication des différents niveaux d'organisation de la structure de l'intestin : les plis, les villosités et les microvillosités.

Les valvules conniventes sont des replis permanents de la paroi intestinale qui forcent le chyme² à tourner sur lui-même afin de le mélanger avec le suc intestinal (mélange d'enzymes protéolytiques) et permettre l'absorption complète des nutriments.

A la surface de ces plis se trouvent les villosités intestinales, extensions de la muqueuse en forme de doigts, qui comportent en leur coeur un réseau de capillaires sanguins et un vaisseau lymphatique spécialisé appelé vaisseau chylifère. Chaque villosité possède également une bande de muscle lisse lui permettant des contractions et allongements successifs qui

¹Certains auteurs font la distinction entre bordure en brosse et plateau strié, la première désignant un ensemble de microvillosités plus longues et moins régulièrement disposées que le second. En anglais, et donc dans l'ensemble des articles traitant de ce sujet, on parle de «brush border», c'est-à-dire de bordure en brosse.

²Mélange d'aliments broyés et de suc gastrique.

augmentent encore l'absorption par un contact accru et font circuler la lymphe des vaisseaux chylifères.

Les villosités sont recouvertes d'un épithélium prismatique simple³ constitué essentiellement d'entérocytes (80 % des cellules de l'épithélium). Ces cellules comportent la dernière spécialisation structurale augmentant la surface d'absorption : la bordure en brosse. Elle est formée d'une multitude de petites protrusions cytoplasmiques appelées microvillosités.

Les entérocytes sont issus des cellules souches qui se trouvent par groupes de 4 à 16 au fond des cryptes de Lieberkühn⁴ représentées sur la figure I.1.2. Ces cellules forment également par division rapide les trois autres types de cellules de ce tissu :

- les cellules caliciformes, sécrétant du mucus lubrifiant et protégeant la muqueuse ;
- les cellules de Paneth, sécrétant des substances antimicrobiennes dont le lysozyme, une enzyme antibactérienne ;
- les cellules neuroendocrines qui sécrètent des hormones agissant sur la muqueuse, le foie et le pancréas.

Les cellules épithéliales, une fois formées par division des cellules souches, migrent le long des villosités tout en se différenciant⁵, jusqu'au sommet où elles seront éliminées dans la lumière de l'intestin (desquamation), entraînant le renouvellement de l'épithélium tous les 3 à 6 jours. Le stade de différenciation des entérocytes change donc suivant leur position sur la villosité [Marieb, 1999].

Physiologie de la digestion et absorption

Nous allons examiner maintenant la transformation des aliments en nutriments assimilables par l'organisme et leur absorption par la muqueuse intestinale.

Avant de parvenir à l'intestin, les aliments ont subi des transformations mécaniques et chimiques successives dans la bouche et l'estomac.

Dans la bouche a lieu la mastication des aliments (digestion mécanique) et le mélange de ceux-ci à la salive qui contient des enzymes comme l'amylase salivaire amorçant la dégradation des sucres⁶ en fragments plus petits (digestion chimique).

Dans l'estomac, la plupart des protéines sont dénaturées par le pH faible du suc gastrique (entre 2 et 3). Des enzymes (la pepsine) commencent la dégradation chimique des protéines tandis que seules certaines molécules comme l'alcool, l'aspirine et d'autres médicaments peuvent être absorbées⁷.

L'intestin, aidé par le foie, la vésicule biliaire et le pancréas, a donc pour rôle de finir la

³C'est-à-dire formé d'une seule couche de cellules qui sont plus hautes que larges.

⁴Sortes de petits sacs situés à la base des villosités.

⁵C'est-à-dire en acquérant les propriétés qui les distinguent des autres cellules.

⁶C'est de là que vient le goût sucré que prend le pain lorsqu'on le mâche longuement.

⁷D'où la rapidité de l'effet de leur ingestion, alors que l'assimilation des autres aliments prend plusieurs heures.

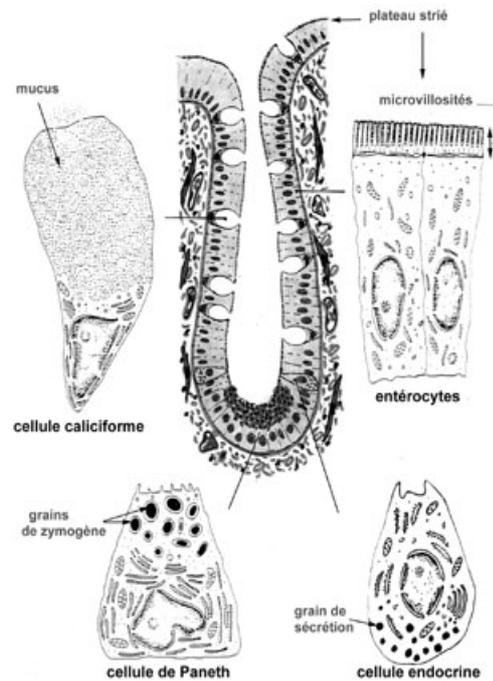


FIG. I.1.2: **Structure des cryptes de Lieberkühn et des quatre types de cellules épithéliales retrouvées sur les villosités** (image N. Vacheret, UCB Lyon). Vue en coupe longitudinale montrant la distribution des différents types cellulaires dans l'intestin adulte.

digestion des sucres, des protéines et de digérer l'essentiel des lipides. Il doit en outre assurer l'absorption de ces nutriments ainsi que celle de l'eau (principalement dans le côlon).

Les dernières phases de la digestion se passent à la surface des entérocytes, au niveau de la bordure en brosse où sont présentes de nombreuses enzymes. Toute l'absorption se fait également par la bordure en brosse, d'où l'importance de l'étude des phénomènes de transport ayant lieu dans cette région pour la compréhension de la physiologie de l'intestin et des pathologies éventuelles.

Les sucres non dégradés par l'amylase salivaire le sont par l'amylase pancréatique, puis par les enzymes présentes à la surface des entérocytes comme la dextrinase et la glucoamylase. Une fois transformés en monosaccharides, les sucres pénètrent dans les cellules par co-transport avec les ions sodium, puis sont acheminés aux capillaires sanguins.

Les protéines suivent également une digestion enzymatique qui les dégradent en leurs composants de base, les acides aminés. La première phase se situe dans l'estomac par l'action de la pepsine⁸ qui dissocie les protéines en polypeptides et quelques acides aminés libres à hauteur de 10 à 15% des protéines ingérées. Arrivés dans l'intestin, ces polypeptides sont hydrolysés par les enzymes pancréatiques comme la trypsine et la chymotrypsine pour former des polypeptides plus petits. Ceux-ci sont alors scindés en acides aminés simples par la carboxypeptidase, sécrétée par le pancréas, et les enzymes de la bordure en brosse comme la dipeptidase et l'aminopeptidase. Ces acides aminés peuvent être alors absorbés par les entéro-

⁸Un groupe d'enzymes protéolytiques.

cytes par transport actif (avec un cotransport des ions sodium). Les dipeptides ou les tripeptides (formés de 2 ou 3 acides aminés, respectivement) peuvent également être absorbés. Ils seront alors dégradés en acides aminés simples par la cellule avant de rejoindre les capillaires sanguins par diffusion.

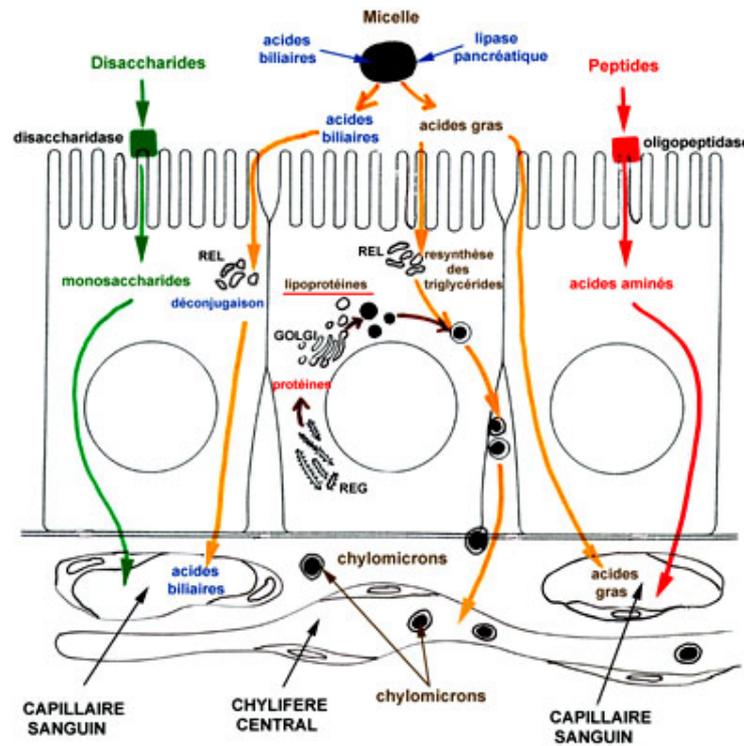


FIG. I.1.3: Schéma récapitulatif simplifié de l'absorption des nutriments par les entérocytes et de leur transport trans-épithélial (N. Vacheret, UCB Lyon). A gauche est schématisée la voie d'absorption des sucres, au centre celle des lipides, et à droite, celle des peptides.

Les lipides, constitués majoritairement de triglycérides et de triglycérols dans notre alimentation, sont, à leur arrivée dans l'intestin, agglomérés en gros amas graisseux offrant peu de surface d'action aux enzymes lipolytiques (ou lipases). Ils sont donc d'abord transformés en une émulsion stable par l'action des sels biliaires (acide cholique, chénodesoxycholique) qui agissent comme des détergents. Les lipases pancréatiques peuvent ensuite agir sur ces gouttelettes d'environ $1 \mu\text{m}$ de diamètre pour dégrader les lipides en acides gras libres et en monoglycérides. Ceux-ci s'associent aux sels biliaires pour former des micelles qui peuvent, par leur taille, diffuser entre les microvillosités pour entrer en contact avec la membrane plasmique. Une fois dans la cellule, les acides gras libres et les monoglycérides servent à synthétiser des triglycérides dans le réticulum endoplasmique lisse. Ces derniers, combinés à des phospholipides et à du cholestérol, forment, par traitement par l'appareil de Golgi, des chylomicrons, petites gouttelettes hydrosolubles de lipoprotéines, qui migrent ensuite vers le vaisseau chylifère [André et al., 1999, Marieb, 1999].

Les ultimes étapes de la digestion et de l'absorption sont résumées sur la figure I.1.3. On voit que l'absorption des lipides, des peptides et des glucides se fait exclusivement par la bordure en brosse des entérocytes. L'internalisation de molécules dans cette région est donc primordiale pour le bon fonctionnement de la digestion et donc pour l'organisme dans son ensemble.

On voit par ce qui vient d'être décrit l'importance de la bordure en brosse dans la digestion et l'absorption des aliments. C'est pourquoi il est fondamental de mieux comprendre les phénomènes dynamiques siégeants dans cette région des entérocytes ainsi que sa relation avec le reste de la cellule. Dans la suite de cette partie, nous allons donc décrire plus précisément cette structure et ses principaux constituants.

I.1.1.2 Les entérocytes

Nous allons maintenant détailler les propriétés des entérocytes, en particulier la structure responsable de la majorité des échanges entre la lumière de l'intestin et l'intérieur des cellules : la bordure en brosse.

La polarité cellulaire

Les entérocytes ont comme fonctions principales l'absorption des nutriments et la formation d'une barrière entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'organisme. La mise en oeuvre de ces fonctions repose sur une asymétrie morphologique de ces cellules avec une spécialisation de la membrane plasmique, la bordure en brosse, du côté de la lumière intestinale (pôle apical). La partie qui est en contact avec les autres cellules et la matrice extracellulaire est appelée pôle ou domaine basolatéral. La figure I.1.4 montre des entérocytes avec ces deux domaines apical et basolatéral.

L'asymétrie morphologique des entérocytes s'appuie sur une différence de composition de la membrane plasmique entre les deux domaines, ainsi que sur une asymétrie dans l'organisation du cytosquelette et du cytoplasme.

Les entérocytes forment une barrière étanche grâce aux jonctions serrées (*zonula occludens*) joignant les cellules adjacentes entre elles par un contact très étroit [Zahraoui et al., 2000]. De plus, elles permettent le maintien de l'asymétrie de la composition de la membrane plasmique entre les domaines apical et basolatéral en empêchant les protéines et les lipides de ces deux domaines membranaires de se mélanger, cette ségrégation étant essentielle au bon fonctionnement de la cellule.

Les jonctions serrées font partie d'un complexe jonctionnel (voir figure I.1.5) comportant également :

- les jonctions adhérentes (*zonula adhaerens*), formées de cadhérines, qui servent aussi à réunir les cellules adjacentes entre elles ;

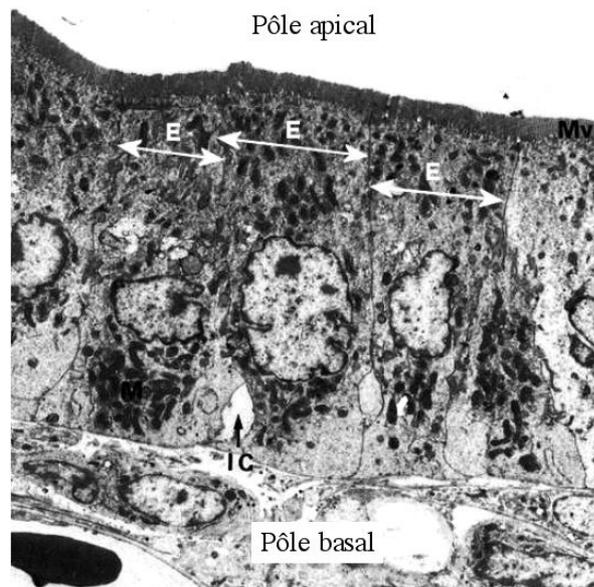


FIG. I.1.4: Polarité des entérocytes vue en microscopie électronique. On peut distinguer la bordure en brosse au pôle apical des cellules qui forme une bande plus sombre et régulière (E : entérocytes, Mv : microvillosités).

- les desmosomes, sortes de disques formés de protéines transmembranaires, qui servent de liaison entre les cellules ;
- les jonctions communicantes (*gap-junctions*), constituées de connexines, qui forment des canaux intercellulaires et permettent une communication directe entre les cellules adjacentes.

Dans l'intestin, les jonctions sont présentes dans les entérocytes tout le long des villosités. *In vitro*, les cellules isolées ne comportent pas de jonctions. Elles se polarisent lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est-à-dire quand elles établissent un contact avec leurs voisines, et lors de l'adhésion à un substrat [Yeaman et al., 1999].

La bordure en brosse

La bordure en brosse est constituée d'un ensemble de microvillosités (plusieurs milliers par cellule) régulièrement espacées d'une hauteur d'environ 1 à 2 μm et d'un diamètre de 0,1 μm [André et al., 1999] et d'un réseau de filaments sous-jacents formant le plateau ou réseau terminal (*terminal web*). La figure I.1.6 montre la structure de la bordure en brosse vue en microscopie électronique.

Dans chaque microvillosité, la membrane plasmique est soutenue par 20 à 30 filaments d'actine, organisés en faisceau et qui plongent en-dessous du niveau de la membrane dans le plateau terminal. L'extrémité des microvillosités comporte une sorte de coiffe de matière dense aux électrons dont la composition est inconnue à ce jour. La membrane est recouverte d'une enveloppe formée de sucres liés à des protéines transmembranaires ou adsorbées (glycoprotéines), le glycocalix. Il protège la membrane plasmique contre l'autodigestion et «héberge»

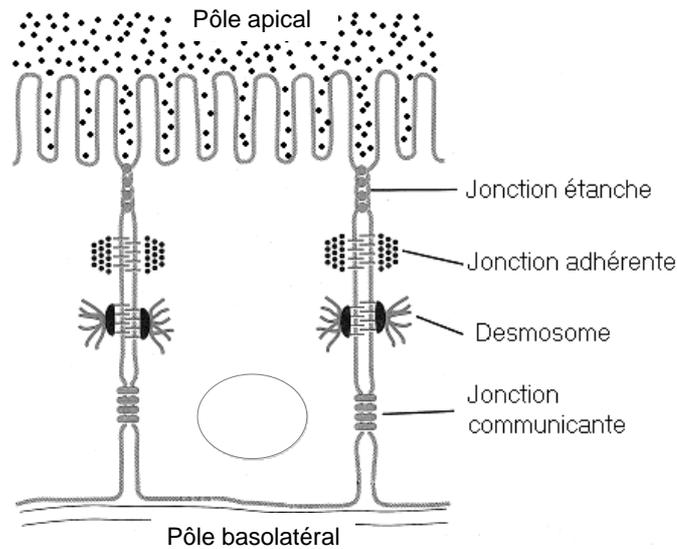


FIG. I.1.5: Les différentes jonctions intercellulaires présentes dans les entérocytes (Adapté de [Alberts et al., 1995]). Les jonctions étanches assurent la séparation des milieux extracellulaires apical et basolatéral.

les enzymes nécessaires aux étapes finales de la digestion, comme nous l'avons vu précédemment. En plus de l'actine, on trouve plusieurs autres protéines qui lui sont liées. Les principales sont la villine, la fimbrine, toutes deux liant les filaments d'actine pour former des faisceaux, la myosine I de la bordure en brosse (BBMI : *brush border myosin I* ou MYO1A⁹) et l'eitrine, qui lient les filaments à la membrane plasmique. BBMI, associée à la calmoduline, forme de fins filaments latéraux entre le faisceau de filaments d'actine et la membrane plasmique, distribués suivant une hélice d'un pas de 33 nm. Nous pouvons voir l'espacement régulier des molécules de BBMI associée à la calmoduline sur la figure I.1.7.

Le plateau terminal, domaine sous-jacent aux microvillosités, est constitué d'un réseau dense de microfilaments d'actine. On distingue un «feutrage» au niveau des racines (*rootlets*) des microvillosités (voir figure I.1.6) et une ceinture de filaments au niveau de la membrane latérale. Cette dernière est associée aux jonctions serrées [Coudrier et al., 1988]. Il existe aussi un réseau de filaments intermédiaires (constitués de cytokératine), situé plus vers le pôle basal, associé aux desmosomes.

Composition membranaire

Les entérocytes possèdent une membrane plasmique séparée en deux domaines qui ont des fonctions différentes. La membrane plasmique a donc une composition en protéines et en lipides différente au pôle apical et au pôle basolatéral. La différence la plus significative est

⁹Il existe une nouvelle nomenclature de la classe des myosines I qui préconise le nom de MYO1A pour BBMI [Gillespie et al., 2001], mais dans ce mémoire, nous conserverons le nom usuel.

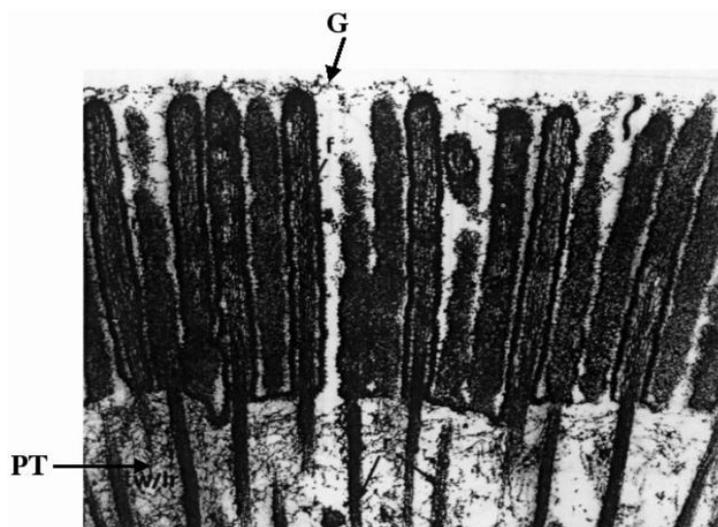


FIG. I.1.6: Coupe longitudinale d'un entérocyte dans le domaine apical, vue en microscopie électronique (image M.S.Mooseker, Yale University). On distingue bien le glycocalix (G) et les filaments d'actine à l'intérieur des microvillosités, qui se prolongent en-dessous de la surface cellulaire. P.T. : plateau terminal.

la proportion en glycosphingolipides qui est nettement plus élevée dans la membrane apicale (voir Table I.1.1), conduisant à une plus faible fluidité de la membrane. Il y a également moins de phosphatidylcholine, les autres lipides étant en parts sensiblement égales. La forte présence

Lipides	Membrane apicale d'intestin de lapin (% mol)	Membrane apicale d'intestin de rongeur (% mol)	Membrane basolatérale d'intestin de rongeur (% mol)
Glycolipides	35 ± 4	37 ± 9	19.5 ± 13
Phospholipides	34.4 ± 3	32 ± 7	52 ± 13
Phosphatidylcholine	10 ± 2	9 ± 4	32 ± 2
Lipides neutres	30 ± 5	31 ± 3	28 ± 3
Cholestérol/ phospholipides	0.50 ± 0.10	0.98 ± 0.13	0.61 ± 0.21

TAB. I.1.1: Composition lipidique de la membrane plasmique de la bordure en brosse (D'après [Simons and van Meer, 1988]). La différence de composition entre la membrane apicale et la membrane basolatérale est particulièrement manifeste pour les trois premiers types de lipides.

de glycolipides suggère, à cause de leur capacité à former des liaisons hydrogène intermoléculaires, qu'ils peuvent contribuer à la stabilité de la membrane et à sa protection contre le milieu extérieur particulièrement agressif dans cette région [Schulthess and Hauser, 1995]. Le fort enrichissement de la membrane de la bordure en brosse en cholestérol pourrait être dû à son rôle potentiel dans la régulation de certaines fonctions de transport [Thomson et al., 1993]. La membrane basolatérale, quant à elle, a une composition proche de la membrane plasmique des cellules non-polarisées.

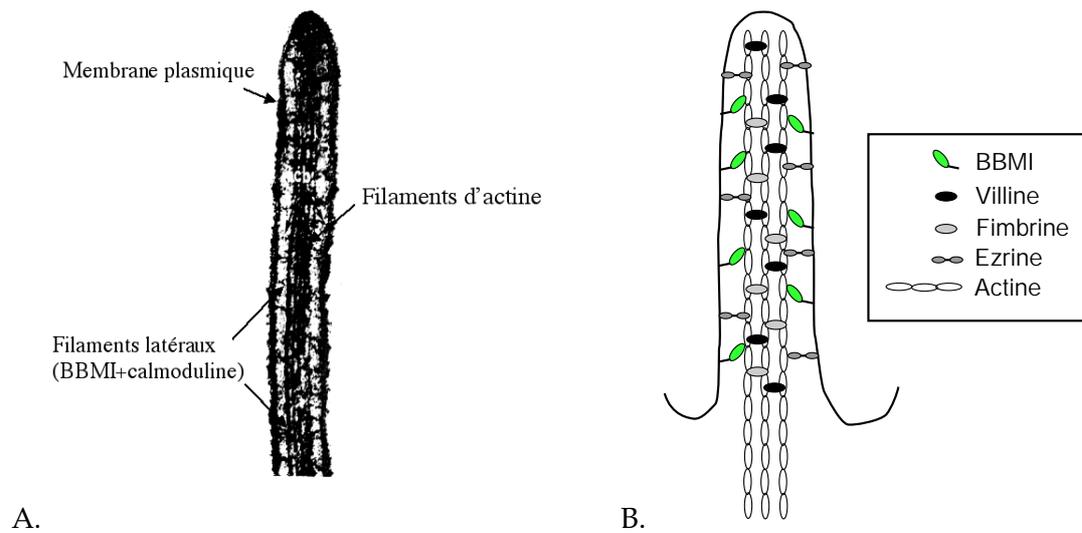


FIG. I.1.7: **Structure moléculaire des microvillosités de la bordure en brosse.** A. Détail d'une microvillosité vue en microscopie électronique (image M.S.Mooseker, Yale University). On note les fins filaments constitués de BBMI et de calmoduline liant le faisceau de filaments d'actine à la membrane plasmique. B. Vision schématique de la structure du cytosquelette d'une microvillosité.

Un autre type d'asymétrie s'ajoute au niveau de la membrane apicale, celle qui existe dans la composition des deux feuilletts de la bicouche lipidique. En effet, la phosphatidylcholine et les glycolipides sont situés sur le feuillet externe, tandis que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine sont localisées sur le feuillet interne. Cette asymétrie est probablement formée par l'action de l'aminophospholipide translocase qui permet cette ségrégation malgré les transferts spontanés entre les deux feuilletts (phénomène de «flip-flop») en consommant de l'ATP.

Formation de la bordure en brosse

Nous allons maintenant examiner la formation de la bordure en brosse et la façon dont ses constituants s'assemblent au cours de la morphogenèse, que ce soit dans le cas de l'embryogenèse ou de la différenciation des entérocytes adultes.

Lors de la formation de l'épithélium intestinal chez l'embryon, on observe d'abord un gonflement de la surface apicale de chaque cellule qui se couvre de petites projections membranaires. Les filaments d'actine présents sous la surface s'alignent ensuite pour former des faisceaux à l'intérieur des protrusions. Les microvillosités ainsi formées deviennent plus régulières et nombreux au cours du développement, avec une taille uniforme (voir figure I.1.8).

Dans la dernière phase de la morphogenèse, les microvillosités s'alignent entre elles perpendiculairement à la surface cellulaire et s'allongent. D'un point de vue moléculaire, toutes les protéines sont présentes dans la cellule avant d'être localisées dans la bordure en brosse et

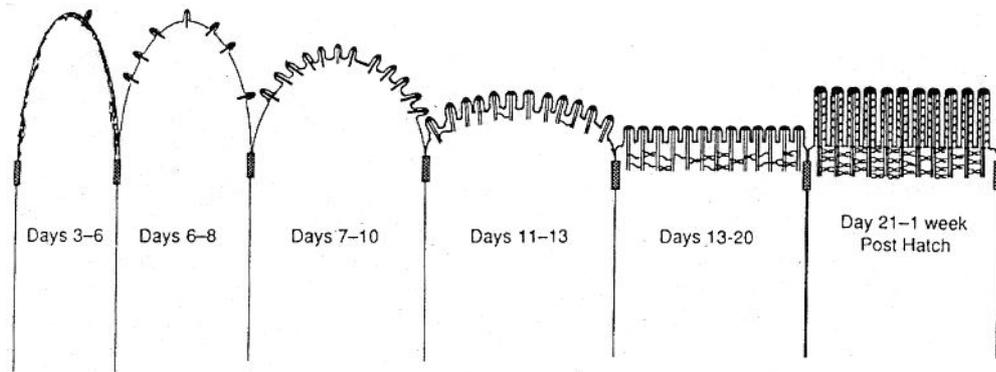


FIG. I.1.8: Schéma hypothétique de la formation de la bordure en brosse lors du développement de l'embryon. [Heintzelman and Mooseker, 1992]. Les microvillosités deviennent plus denses et plus longues au cours du développement pour atteindre un état stationnaire bien organisé (vers 21 jours chez le poulet).

on peut suivre le changement de leur localisation au cours de la différenciation de la cellule. Durant l'embryogenèse, l'ezrine est la première à se trouver au pôle apical de la cellule, suivie par la villine et la fimbrine, puis, en dernier, par BBMI [Louvard et al., 1992, Arpin and Friederich, 1992]. Le schéma temporel de localisation des protéines varie suivant les espèces considérées, mais l'ordre semble conservé.

Lors de la différenciation des entérocytes le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin adulte, les microvillosités suivent un développement un peu différent de celui ayant lieu chez l'embryon. Dans la crypte, elles sont courtes et dispersées sur la surface de la cellule, formant un angle avec celle-ci. Les faisceaux de filaments d'actine se prolongent sur 1 μm ou plus en-dessous de la membrane plasmique. Au cours de la migration vers le sommet de la villosité, les microvillosités deviennent plus nombreuses, plus denses et se positionnent perpendiculairement à la surface cellulaire. En parallèle, le plateau terminal se forme et le réseau de filaments se fait plus dense, augmentant ainsi la rigidité et l'organisation des microvillosités [Heintzelman and Mooseker, 1992]. Comme chez l'embryon, les microvillosités se forment suivant un schéma défini temporellement et spatialement. Néanmoins, l'expression des protéines lors de la maturation des entérocytes adultes est différente. La villine et la fimbrine sont déjà présentes au domaine apical dans les cryptes de Lieberkühn, alors que BBMI apparaît plus tard, à la transition entre la crypte et la villosité et reste exprimée de façon constante durant le reste de la migration cellulaire. Le fait que l'on n'observe pas de changement de localisation des protéines autres que BBMI peut être dû au fait que les étapes de la différenciation se succèdent beaucoup plus rapidement dans l'intestin adulte (2 à 4 jours suivant l'espèce) qu'au cours du développement chez l'embryon (environ 21 jours chez le poulet et 22 semaines chez l'humain) et pourraient ne pas être observées par les techniques utilisées.

L'étude de l'expression des protéines du cytosquelette et de leur schéma temporel de localisation amène la question de leur contribution dans l'assemblage de la bordure en brosse. Ainsi, la villine, quand elle est produite ou injectée dans des cellules de culture ne l'exprimant pas, induit la formation de microvillosités dans des cellules n'en possédant pas. Par contre, les

souris knock-out pour la villine sont viables et possèdent une bordure en brosse bien organisée. Cette contradiction pourrait s'expliquer par le remplacement dans ces souris de la villine par une autre protéine ayant des propriétés proches, la compensation de sa fonction par la fimbrine ou bien par le fait que la villine a une fonction différente *in vivo* et dans les cellules de culture.

On sait que la formation des microvillosités durant le développement est concomitante de l'expression de la fimbrine. Néanmoins, la surexpression de cette protéine dans des cellules de culture montre que celle-ci ne peut pas organiser les filaments d'actine en une bordure en brosse bien organisée. Quant à l'eitrine, l'utilisation de formes tronquées de la protéine a montré qu'elle semble jouer un rôle important dans l'organisation du pôle apical des entérocytes et dans leur différenciation [Louvard et al., 1992, Arpin et al., 1999, Arpin and Friederich, 1992]. Nous aborderons le rôle de BBMI dans une partie spécifique.

I.1.2 Dynamique de la bordure en brosse à l'état stationnaire

I.1.2.1 Vers une connaissance de la dynamique de la bordure en brosse

Une fois la bordure en brosse formée, elle ne peut conserver sa structure sans des mécanismes dynamiques de maintenance. En effet, la taille des microvillosités peut varier suivant les conditions physiologiques dans l'intestin, ce qui suppose un mécanisme dynamique de régulation de leur longueur. De plus, le renouvellement par biosynthèse des protéines membranaires et du cytosquelette est plus rapide (quelques heures) que le temps de migration des entérocytes le long des villosités (2 à 3 jours), suggérant un réassemblage dynamique de la structure [Stidwill et al., 1984].

Il existe donc des processus dynamiques de maintien de la composition membranaire et de la structure de la bordure en brosse. Plusieurs voies de transport intracellulaires pourraient être impliquées dans l'acheminement et le tri des protéines membranaires. Les candidats les plus probables pour assurer un réassemblage de la structure de la bordure en brosse sont l'actine, qui est capable d'induire des mouvements cellulaires, et la myosine I de la bordure en brosse, qui a la capacité de se déplacer sur l'actine et d'exercer une force sur une charge accrochée à elle, *in vitro*.

Nous allons donc examiner les propriétés de ces deux protéines et leur rôle possible dans la dynamique de la bordure en brosse.

I.1.2.2 Dynamique du cytosquelette d'actine

Dynamique de polymérisation de l'actine *in vitro*

L'actine monomérique (ou actine-G) est une petite protéine globulaire, très abondante dans les cellules (5-20 % de la masse cellulaire), d'une taille d'environ 5,5 nm, capable de former des

filaments par polymérisation (actine-F). Elle possède un site de liaison à l'ATP ou l'ADP et un site de liaison aux ions divalents tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Chaque monomère a une structure asymétrique, ce qui implique que les polymères d'actine eux-même soient asymétriques (ou polaires). La polymérisation se fait en trois étapes : l'*activation*, durant laquelle les monomères s'associent au Mg^{2+} et changent de conformation, la *nucléation*, où ils se regroupent en oligomères (ou «noyaux») de trois unités généralement, et enfin, l'*élongation*, où de nouveaux monomères activés s'ajoutent aux noyaux pour former des filaments d'actine. La polymérisation s'arrête une fois que l'actine-G atteint une concentration d'équilibre, appelée concentration critique (Cc).

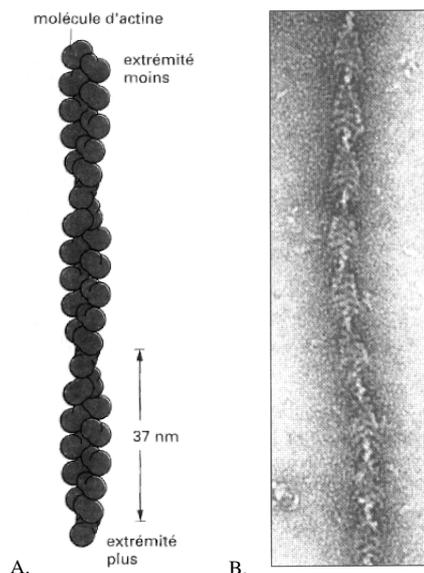


FIG. I.1.9: **La structure des filaments d'actine.** A. Assemblage des monomères d'actine sous forme de double hélice formant un filament, B. Filament «décoré» par des têtes de myosines vu en microscopie électronique. (D'après [Alberts et al., 1995])

Une fois polymérisée, l'actine forme une double hélice de diamètre apparent variant entre 5 et 8 nm (à cause de l'hélicité) et de période 37 nm (voir figure I.1.9 A.). La polarité des filaments peut être mise en évidence en les «décorant» de domaines moteurs de myosines. Les filaments décorés ont l'aspect de têtes de flèche (voir figure I.1.9 B.) ce qui permet de visualiser leur polarité et de définir une extrémité «barbée» (ou extrémité +) et une extrémité «pointue» (ou extrémité -). L'association et la dissociation des monomères se fait avec une vitesse différente à chaque extrémité, bien que les rapports des taux d'association/dissociation soient identiques.

L'ATP joue un rôle de régulation de la polymérisation de l'actine. En effet, au cours de la polymérisation en présence d'ATP, la liaison des monomères entre eux permet l'hydrolyse de l'ATP au sein du filament d'actine, la réaction ne se produisant pas pour les monomères libres. Le filament d'actine va donc rapidement avoir une différence de composition à chaque extrémité, les monomères liés à l'ATP se trouvant vers l'extrémité + et les monomères liés à l'ADP se trouvant vers l'extrémité -. Or l'affinité des monomères liés à l'ADP pour ses voisins

est plus faible, ce qui entraîne un taux de dissociation plus grand. Le rapport entre les taux d'association et de dissociation ne sont donc plus les mêmes à chaque extrémité, ce qui conduit à une différence de concentration critique entre les deux extrémités du filament. Ainsi, lorsque la concentration d'actine-G est telle que : $C_{c+} < C_{actine-G} < C_{c-}$, les monomères s'ajoutent au filament à l'extrémité + et se détachent à l'extrémité -, conduisant à un mouvement des monomères à l'intérieur du filament. On parle de phénomène de tapis roulant (*treadmilling*), schématisé sur la figure I.1.10. La vitesse *in vitro* est estimée à $0,05 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Dans ces condi-

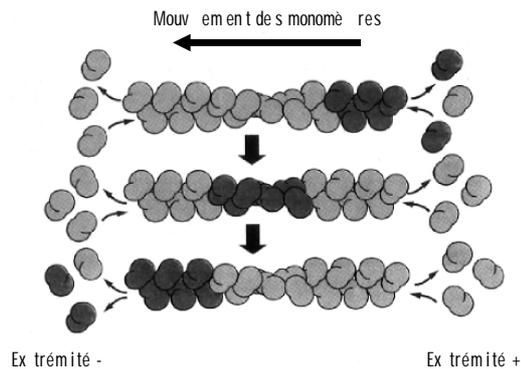


FIG. I.1.10: Le phénomène de tapis roulant (*treadmilling*). Les monomères plus sombres mettent en évidence le mouvement de ceux-ci au sein du filament (de la droite vers la gauche).

tions, les monomères qui s'ajoutent sont liés à l'ATP. Ils évoluent vers l'extrémité - tandis que l'ATP va s'hydrolyser, et se dissocier sous la forme d'actine-ADP.

Le mouvement de tapis roulant ne se produit que s'il y a hydrolyse de l'ATP. En présence d'actine-ADP seule, la concentration critique reste la même aux deux extrémités. Dans ce dernier cas, le filament d'actine atteint un état d'équilibre statique, alors qu'en présence d'ATP, il atteint un état d'équilibre dynamique.

Dynamique et rôle de l'actine dans les cellules

L'actine, nous l'avons vu, est une protéine très abondante dans les cellules et en particulier dans les cellules musculaires. Elle joue de multiples rôles dans les cellules, de façon statique ou dynamique. Elle est très souvent associée à d'autres protéines qui peuvent réguler sa polymérisation en coiffant l'une ou l'autre des extrémités (villine, gelsoline, par exemple), empêchant ainsi l'ajout de nouveaux monomères, ou en séquestrant l'actine-G (comme la thymosine $\beta 4$). La profiline est ainsi connue pour séquestrer les monomères d'actine et accélérer l'échange du nucléotide, ce qui entraîne une accélération de la polymérisation des filaments. Cette protéine intervient *in vivo* dans la formation de la comète de la bactérie *Listeria Monocytogenes* [Theriot et al., 1994]. D'autres peuvent rigidifier les filaments, comme la tropomyosine, relier les filaments entre eux en réseau dense pour former un gel (comme l'alpha-actinine) ou bien

en faisceau, comme la fimbrine. L'interaction des filaments d'actine avec les autres structures de la cellule comme la membrane plasmique se fait également grâce à des protéines de liaison à l'actine ou même des complexes protéiques¹⁰. Une autre grande classe de protéines utilisent l'actine-F comme support à leur déplacement ou à leur fixation. Il s'agit des myosines que nous aborderons plus loin.

D'un point de vue «statique», l'actine a un rôle structural. Par exemple, elle forme le cortex cellulaire des cellules eucaryotes, sous-tend la membrane des protrusions cellulaires comme les microvillosités ou forme les fibres de tension (*stress fibers*), ensembles de filaments maintenus en faisceaux à la base des cellules, leur permettant de s'accrocher à leur support, par l'intermédiaire de complexes protéiques membranaires (les plaques d'adhérence). Les filaments d'actine apparaissent dans les cellules sans orientation particulière de leur polarité, mis à part lorsqu'ils sont en interaction avec les membranes. Dans ce cas, ils sont orientés avec l'extrémité + vers la membrane. Par exemple, dans la bordure en brosse, les filaments d'actine sont tous orientés avec leur extrémité + vers le haut de la microvillosité. Malgré cette orientation, il semble, d'après des études sur la morphologie des spermatozoïdes chez le crabe et sur le front d'avancement des lamellipodes des kératocytes, que l'ajout de monomères se produise entre la membrane et l'extrémité + [Amos and Amos, 1991].

L'actine sert également de support aux mouvements contractiles dans les cellules musculaires ou non. Très schématiquement, dans les cellules des muscles striés, les filaments d'actine sont parallèles et intercalés avec des filaments de myosine II. Ces deux populations de filaments «glissent» de façon active l'une par rapport à l'autre à l'unisson, entraînant la contraction de la cellule et, par coopération, du muscle dans son ensemble. Dans les cellules non-musculaires, l'actine sert à la contraction de l'anneau contractile au cours de la division cellulaire, ou de réseau de transport d'organelle via l'activité des myosines.

D'un point de vue dynamique, l'actine est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires, comme la migration ou la locomotion des cellules, la propulsion de la bactérie *Listeria monocytogenes* ou la croissance de protrusions membranaires. La migration cellulaire (des fibroblastes ou des neutrophiles, par exemple) se fait en trois étapes principales : *la protrusion*, durant laquelle se forme une excroissance de membrane (le lamellipode) contenant des filaments d'actine, *l'attachement*, où la structure d'actine se lie à la membrane et au support de la cellule grâce aux protéines de liaison, et *la traction*, pendant laquelle se produit une contraction de la cellule [Alberts et al., 1995]. Dans le lamellipode, l'actine forme un réseau dense avec de nombreux branchements. La polymérisation se fait préférentiellement au front de migration et serait facilitée et organisée par plusieurs protéines, comme Arp 2/3 ou VASP. Il y a un gradient de filaments d'actine dans la cellule et peu de fibres de tension, ce qui signale une grande dynamique de tout le cytosquelette d'actine et une faculté de réarrangement rapide de sa structure. Il a été observé dans certaines cellules, la formation de comètes d'actine propulsant des

¹⁰C'est le cas pour la liaison de l'actine aux jonctions serrées ou aux plaques d'adhérence. Un complexe d'au moins six protéines se forme pour assurer le lien entre l'actine et la membrane.

vésicules, de façon analogue aux comètes de *listeria* [Taunton et al., 2000]. L'actine a probablement un rôle dans l'endocytose, en particulier l'actine corticale qui pourrait se déformer et se réarranger lors de l'invagination de la membrane plasmique ou bien être éliminée pour laisser la place à la vésicule pour se former. Nous voyons au travers ces quelques exemples l'importance de la dynamique de l'actine pour de nombreuses activités cellulaires. Cependant, beaucoup de questions restent en suspens, notamment quel est le rôle de l'actine dans les microvillosités intestinales ? Est-ce que l'actine est en équilibre dynamique ou statique ? Observe-t-on un mouvement de tapis roulant ? La réponse à ces questions permettrait de mieux comprendre comment la structure de la bordure en brosse se maintient et par quels mécanismes elle peut s'adapter aux changements de condition physiologique de l'intestin (en cas de diète prolongée, par exemple).

Bien que nous n'ayons examiné que le rôle de l'actine filamentueuse, les cellules contiennent aussi de l'actine monomérique, et l'on considère que la proportion des deux formes est de 50 %. Cependant, il semble que l'actine-G, dans ce contexte, n'ait pas de rôle biologique direct et ne serve que de «réservoir» pour la polymérisation. Elle a néanmoins un rôle dans la régulation de la synthèse de l'actine.

I.1.2.3 La myosine I de la bordure en brosse

La myosine I de la bordure en brosse (identifiée en 1978 [Mooseker et al., 1978]) est une protéine abondante¹¹ dans les microvillosités où elle est liée à l'actine d'un côté et à la membrane plasmique de l'autre. Elle possède les caractéristiques d'une protéine motrice et fait partie de la classe des myosines I. Malgré notre connaissance de sa localisation cellulaire et de sa structure, nous n'avons que très peu d'information quant à son rôle dans la cellule et en particulier dans les microvillosités. Dans cette section, après un bref aperçu de ce qu'est une protéine motrice, et, en particulier, des myosines, nous décrirons la structure de BBMI, son activité enzymatique, son interaction avec les membranes lipidiques, la régulation de son activité et, enfin, nous ferons le bilan des connaissances et des hypothèses sur son rôle dans la cellule.

Les myosines I

Les myosines sont des protéines motrices ou moteurs moléculaires. Ce sont des enzymes (plus précisément des mécano-enzymes) capables de transformer l'énergie chimique fournie par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique en interagissant avec les filaments d'actine.

Malgré des différences importantes entre elles, les myosines ont des similitudes de structure qui les distinguent des autres protéines. Ainsi, elles possèdent toutes un ou deux domaines globulaires d'environ 80 kD appelés «têtes» comportant le site d'hydrolyse de l'ATP et de liaison aux filaments, une région intermédiaire en hélice α appelée «cou» qui semble souvent im-

¹¹Quantité estimée à environ 600 molécules de BBMI dans une microvillosité [Bretscher, 1991].

pliée dans le changement de conformation de la molécule, et un domaine carboxy-terminal de longueur et propriété très variables appelé «queue» servant à l'attachement de la protéine à l'objet transporté, de liaison à un support ou encore de liaison des protéines entre elle comme pour la myosine II des cellules musculaires [Berg et al., 2001].

La transformation d'énergie chimique en énergie mécanique se fait en plusieurs étapes que l'on peut résumer en un changement de conformation qui peut être utilisé pour produire un travail mécanique ou exercer une force sur une charge si la protéine est en interaction avec une structure rigide comme un filament d'actine¹². Le mouvement de chaque protéine ne peut se faire que dans une seule direction imposée par la polarité du filament sur lequel elle se déplace. Les myosines sont ainsi contraintes à se déplacer vers l'extrémité + des filaments d'actine, à part la myosine VI qui se déplace dans le sens inverse [Well et al., 1999]. Il existe plusieurs modèles pour expliquer le fonctionnement des moteurs moléculaires. Le plus simple est le modèle du «bras de levier» que l'on peut décomposer en quatre étapes principales (illustrées sur la figure I.1.11) :

- la liaison de l'ATP au site d'hydrolyse sur la tête de la myosine et le détachement de cette dernière du filament d'actine (étape a. sur la figure I.1.11);
- l'hydrolyse de l'ATP et le changement de conformation concomitant (étape b.);
- l'attachement de la tête au filament et le relargage du phosphate libre (étape c.);
- le retour à la conformation de départ exerçant une force sur le filament (*power-stroke*) et le relargage de l'ADP (étape d.).

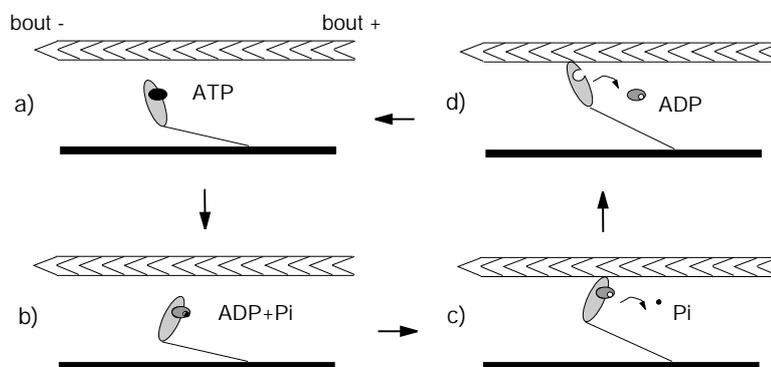


FIG. I.1.11: Mécanisme simplifié du cycle de fonctionnement d'une myosine (modèle du bras de levier). a) : liaison de l'ATP sur la myosine, b) : hydrolyse de l'ATP et changement de conformation, c) : attachement de la tête de la myosine à l'actine, d) : relargage de l'ADP et retour à la conformation initiale.

Ce modèle est cependant trop simpliste et ne permet pas d'expliquer les déplacements observés avec des myosines uniques. En effet, Veigel et coll. ont montré que le mouvement de deux myosines I (myrI et BBMI) se fait en deux pas d'environ 6 et 5,5 nm [Veigel et al., 1999]. De plus, Ishijima et coll. ont montré par la manipulation de myosines uniques que les différents pas se font lors d'un seul cycle d'hydrolyse d'ATP [Ishijima et al., 1998]. Le modèle précédent

¹²Il existe aussi des moteurs qui ne se déplacent pas linéairement sur des filaments, mais qui ont un mouvement rotatif. C'est le cas de la F1-ATPase qui joue un rôle essentiel dans la production d'ATP dans les cellules animales. Nous nous restreindrons ici aux moteurs «linéaires».

ne permet de prédire qu'un seul pas de 5,5 nm. Face à ces nouveaux résultats expérimentaux, il a été proposé un autre modèle dit d'«encliquetage brownien biaisé» (*Biased Brownian ratchet model*) où la force produite par la protéine n'aurait pas de lien avec le relargage de l'ADP (étape d. du modèle précédent). La molécule stockerait l'énergie fournie par l'ATP et l'utiliserait en plusieurs fois pour faire des pas élémentaires d'un monomère d'actine à l'autre [Ishijima et al., 1998]. L'étude du mouvement d'autres myosines pourrait aider la compréhension des mécanismes de la génération de force et des différences de mobilité entre les différentes protéines.

Les myosines forment en effet une famille assez diversifiée, avec 18 sous-familles distinctes à ce jour ¹³. Chez l'homme, on compte 40 gènes de myosines (connus ou prédits) divisés en 12 sous-familles, dont 15 pour la classe des myosines II et 8 pour les myosines I. Le domaine moteur est le mieux conservé entre les différentes protéines et c'est la queue qui diverge le plus d'une myosine à l'autre. Néanmoins, de faibles modifications du domaine moteur ont des effets importants sur le fonctionnement de la protéine comme dans le cas de la myosine VI qui a un mouvement en sens inverse. De plus, certaines myosines ont des extensions à l'extrémité amino-terminale du domaine moteur qui leur confère des propriétés uniques, comme les myosines III, XV, XVI et XVIII. Ces différences de structure leur permettent d'accomplir des fonctions différentes au sein des cellules [Berg et al., 2001]. En effet, les myosines sont impliquées dans divers processus cellulaires, dont les fonctions neurosensorielles, le trafic vésiculaire, la localisation d'autres protéines et le contrôle de la morphologie cellulaire. Les myosines V, par exemple, semblent intervenir dans le transport des mélanosomes dans les mélanocytes et des vésicules synaptiques dans les neurones, ou encore dans l'extension de filopodes dans les cônes de croissance neuronaux [Baker and Titus, 1998].

Les myosines I sont les premières myosines dites «non-conventionnelles» (c'est-à-dire distinctes des myosines II) découvertes. Elles sont présentes en particulier au niveau du cortex d'actine et de certains organelles. Les myosines myoB et myoC ont été ainsi détectées au niveau de la membrane plasmique et des filaments d'actine formant le cortex cellulaire chez l'amibe *Dictyostellium*. Ces myosines semblent contribuer à la génération de la tension corticale [Dai et al., 1999a].

Les différentes myosines I sont classées en fonction de leur domaine carboxy-terminal (domaine de «queue»). L'analyse de la séquence des différentes myosines I montre que celui-ci comprend un premier domaine constitué de 1 à 6 «motifs IQ», c'est-à-dire d'une séquence d'acides aminés IQXXRGXXR, conservée chez toutes les myosines (séquence consensus), où le X représente un acide aminé variable d'une protéine à l'autre. Ensuite, on trouve un domaine spécifique aux myosines I, le domaine TH1 (*Tail Homology 1*) riche en acides aminés basiques et qui a la propriété d'interagir avec des lipides anioniques *in vitro*. Certaines myosines I ont des domaines supplémentaires, toujours à l'extrémité carboxy-terminale. Ainsi, par exemple, la

¹³Il est très probable que d'autres classes s'y ajoutent rapidement, le nombre de myosines découvertes ne cessant d'augmenter.

myosine IC possède un domaine TH2 (aussi appelé GPA/GPQ) riche en proline comportant un site supplémentaire de liaison à l'actine, mais de façon indépendante de l'ATP. Enfin, on trouve un dernier domaine, TH3, formé d'une région SH3 (*Src homology 3*) connue pour interagir avec d'autres protéines.

Dans la bordure en brosse des entérocytes, on trouve des myosines des classes I, II, V, VI et VII [Wolfrum et al., 1998]. Dans les entérocytes matures, la myosine II est localisée spécifiquement dans le plateau terminal, la myosine VI, peu abondante (0,09 % de la quantité totale en protéine dans la bordure en brosse, contre 16,5 % pour la myosine II et 6,3 % pour BBMI), est plus présente dans le plateau terminal que dans les microvillosités et la myosine V, également peu abondante (0,05 %), est présente dans les deux régions, mais plutôt concentrée vers l'extrémité des microvillosités, peut-être au niveau de la coiffe où elle servirait de lien entre les filaments d'actine et la membrane plasmique, éventuellement via d'autres protéines [Heintzelman et al., 1994]. Parmi les myosines I, seules la myosine Ic et BBMI ont été observées [Skowron et al., 1998]. Comme nous l'avons vu, BBMI est localisée spécifiquement dans les microvillosités, cependant elle a été détectée dans le plateau terminal où elle pourrait être associée à des vésicules [Drenckhahn and Dermietzel, 1988]. Au cours de la maturation des entérocytes, la localisation des myosines change. Ainsi, lorsque les cellules sont dans la crypte de Lieberkühn, les myosines II et V sont déjà localisées dans la bordure en brosse, alors que la myosine VI ne s'y trouve pas, de même que BBMI qui est seulement dans le cytosol et au niveau de la membrane basolatérale. Dans les cellules des villosités, BBMI se retrouve très abondamment dans les microvillosités et reste présente à la membrane basolatérale [Heintzelman et al., 1994]. La myosine Ic suit une évolution contraire à celle de BBMI : elle est présente dans les cellules de la crypte, mais elle est en très faible quantité dans les entérocytes matures [Skowron et al., 1998].

Il apparaît que BBMI est la myosine la plus abondante dans les microvillosités, et la seule myosine I présente dans les entérocytes matures. Sa présence dans cette région hautement spécialisée et sa répartition le long de chaque microvillosité en font une protéine essentielle de la bordure en brosse, et il est important de mieux la caractériser pour comprendre la dynamique de la bordure en brosse. Nous allons donc maintenant décrire plus en détail les propriétés de cette protéine.

Structure de BBMI

BBMI est une protéine de 110 kD comportant deux domaines distincts : un domaine globulaire de 90 kD, la «tête» de la myosine, et un domaine plus petit (35 kD) qui constitue la «queue» de la myosine. La structure déduite de l'analyse de la séquence de BBMI est schématisée sur la figure I.1.12.

Le domaine de tête présente une grande homologie avec le domaine moteur de la myosine II (domaine S1), avec un site de liaison de l'ATP et un site de liaison à l'actine. C'est donc par ce

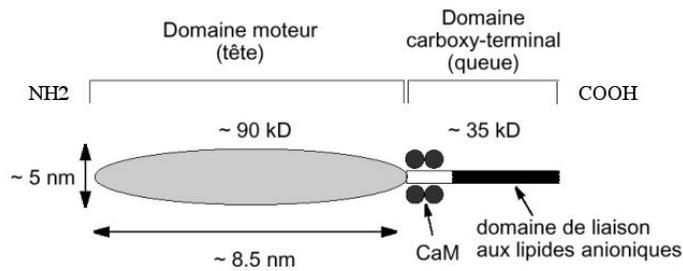


FIG. I.1.12: **Organisation en domaines de la protéine BBMI basée sur l'analyse de sa séquence** (CaM : calmoduline). On distingue essentiellement deux domaines dans la protéine : le domaine moteur («tête») et le domaine de liaison aux lipides («queue»)

domaine que BBMI s'attache aux filaments d'actine et hydrolyse l'ATP pour fournir du travail mécanique.

A l'extrémité amino-terminale de la queue de BBMI, on trouve 3 (le plus fréquemment) ou 4 sites de liaison à la calmoduline, une petite protéine liant le calcium, impliquée dans la régulation de l'activité de nombreuses protéines. Ces sites sont caractérisés par une séquence de 25 acides aminés appelé «motif IQ» de part la présence d'isoleucine (symbole I) et de glutamine (symbole Q) au début de cette structure. Une deuxième région de ce domaine est constituée d'une majorité d'acides aminés basiques qui donne à la queue la faculté de se lier aux lipides anioniques. D'après Swanljung-Collins et coll., il y aurait un site de liaison à l'actine insensible à la présence d'ATP dont le rôle est inconnu à ce jour [Swanljung-Collins and Collins, 1994]. L'existence de ce site n'a cependant pas été confirmée.

La structure tridimensionnelle de BBMI a été modélisée par cryomicroscopie électronique et analyse d'image, ce qui donne des informations complémentaires à l'étude de sa séquence [Jontes and Milligan, 1997b]. Elle confirme la présence des différents domaines déjà décrits et leur organisation spatiale. Ainsi, la BBMI est vue comme une protéine allongée et asymétrique, d'une longueur d'environ 23 nm [Jontes and Milligan, 1997a]. L'angle d'attache de la tête aux filaments d'actine est d'environ 65° , comme pour la myosine II [Whittaker and Milligan, 1997]. La queue fait un angle d'environ 40° avec la tête.

Cette technique a permis également de visualiser et de quantifier le changement de conformation de BBMI lors de l'addition d'ADP. En présence de MgADP à 1 mM, la queue bascule de 31° , ce qui correspond à un déplacement linéaire de 6,3 nm. Cette distance représente environ la moitié de la période d'un filament d'actine, indiquant que BBMI se déplace avec un pas plus petit que la période du filament ou bien qu'elle effectue plusieurs pas durant un seul cycle d'hydrolyse de l'ATP.

Cinétique de l'activité ATPase

Les étapes du cycle d'ATPase de BBMI ont été étudiées *in vitro* par la méthode de «stop-flow» par Jontes et coll. Ces expériences ont montré que la dissociation du complexe actine-BBMI par l'ATP se fait en deux étapes, une première, réversible, de liaison de l'ATP au complexe actine-BBMI, suivie par une deuxième étape, irréversible, de détachement du complexe myosine-ATP de l'actine. Cette dernière étape se fait avec un taux de réaction d'environ 200 s^{-1} , soit 5 fois plus faible que celui de la myosine II du squelette. Cela signifie que BBMI reste attachée à l'actine plus longtemps [Jontes et al., 1997].

Une autre observation intéressante porte sur la dissociation de l'ADP du complexe actine-BBMI. En effet, cette réaction semble se faire en deux étapes qui correspondraient à deux états différents du complexe lors de la production de force. La première étape pourrait être vue comme une étape de «détection de force» pendant laquelle la protéine ferait un premier pas de 6 nm, et qui permettrait l'arrêt du cycle d'hydrolyse si la force exercée sur la protéine est trop grande. Cela révélerait un mécanisme de régulation du mouvement en fonction de la force exercée. Les expériences de Veigel et coll. [Veigel et al., 1999], montrant que le mouvement de BBMI a lieu en deux pas, semblent confirmer la présence de deux étapes de dissociation de l'ADP. On peut estimer la durée totale de la phase de production de force à 50 ms, contre 5 ms pour le domaine S1 de la myosine II [Jontes et al., 1997].

Il semble donc que les myosines les plus lentes comme BBMI et myr-1 (vitesse *in vitro* de $0,01$ à $0,1^{14} \mu\text{m.s}^{-1}$ et $0,04 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivement) produisent une force pendant des temps plus long que des myosines plus rapides, comme la myosine II (vitesse de 2 à $7 \mu\text{m.s}^{-1}$) [Veigel et al., 1999].

Il est important de noter que la durée des états fortement liés, bien que plus importante que d'autres myosines, ne représente que 5 à 10 % de la durée totale du cycle d'hydrolyse, ce qui fait que BBMI reste majoritairement peu ou pas liée à l'actine. Néanmoins, dû à son abondance dans les microvillosités, on peut s'attendre à trouver une fraction non-négligeable de protéines liées à l'actine [Jontes et al., 1997].

Interaction avec les membranes lipidiques

Comme nous l'avons vu précédemment, BBMI interagit avec les lipides anioniques grâce à son domaine carboxyterminal. En fait, cette fonction est une propriété commune aux myosines de la classe des myosines I comme cela a été montré pour la myosine I de *Acanthamoeba* et de *Dictyostelium* [Zot et al., 1992].

¹⁴La vitesse de BBMI dépend des conditions expérimentales. Les différentes valeurs mesurées sont : $0,01 \mu\text{m.s}^{-1}$ greffée sur des billes [Mooseker and Coleman, 1989] avec $10 \mu\text{M}$ de calcium, $0,033 \mu\text{m.s}^{-1}$ quand elle est associée à la membrane de la bordure en brosse en absence de calcium [Mooseker et al., 1989] et $0,07$ à $0,1 \mu\text{m.s}^{-1}$ accrochée à une surface de verre [Collins et al., 1990]

Hayden et coll. ont étudié les propriétés de la liaison de BBMI à des vésicules phospholipidiques. Ils ont montré que BBMI s'attachait à des vésicules contenant des phospholipides anioniques (phosphatidylglycerol et phosphatidylserine), mais pas à ceux contenant des phospholipides neutres (phosphatidylcholine). Cette liaison est réversible par addition de NaCl à 1 M. BBMI liée conserve sa capacité d'hydrolyse de l'ATP en présence d'actine-F et se lie à cette dernière seulement en absence d'ATP, comme la protéine libre [Hayden et al., 1990].

D'autres expériences sur des «disques» de membrane plasmique extraits des microvillosités montrent que BBMI reste liée à ces disques et garde sa faculté de liaison à l'actine et d'hydrolyse. De plus, des billes recouvertes de ces disques peuvent se déplacer sur des filaments d'actine dans le même sens que les myosines (c'est-à-dire vers le bout +), suggérant fortement que BBMI liée à ces disques conserve son activité motrice, avec une vitesse d'environ 33 nm.s^{-1} en moyenne [Mooseker et al., 1989].

Zot a également observé que BBMI associée à des membranes phospholipidiques garde une activité ATPase [Zot, 1995]. Il n'a pas observé de liaison de BBMI avec des membranes faites de lipides de la bordure en brosse, mais seulement avec des membranes contenant 40 % de phosphatidylsérine (contre 16 % pour la bordure en brosse). D'après ces expériences, BBMI ne peut pas faire bouger des filaments d'actine dans ces conditions d'accrochage. Ces résultats suggèrent qu'il existe d'autres facteurs que les lipides pour la liaison de BBMI à la membrane plasmique et pour sa mobilité. Ceci est compatible avec les expériences de Mooseker sur la mobilité des disques de membrane de microvillosités, car ces extraits membranaires contiennent vraisemblablement des protéines qui pourrait jouer le rôle de lien entre BBMI et la membrane. En effet, une glycoprotéine de 140 kD, probablement transmembranaire, a été détectée dans la membrane plasmique de la bordure en brosse et se lie *in vitro* à BBMI, éventuellement via une autre protéine [Coudrier et al., 1983]. Cette protéine pourrait servir à BBMI pour s'accrocher à la membrane plasmique dans les microvillosités, *in vivo*.

Régulation de l'activité *in vitro*

Des expériences *in vitro* montrent que l'activité ATPase de BBMI peut être régulée par les ions Ca^{2+} par le biais de la calmoduline. L'effet du Ca^{2+} sur l'activité de BBMI est, de plus, dépendant de la température du milieu.

A 30°C , l'augmentation de la concentration calcique de 10^{-7} à 10^{-5} M stimule l'activité ATPase dépendant de l'actine de BBMI d'un facteur 2,5. Pour un niveau de Ca^{2+} compris entre 10^{-5} et 10^{-4} M, une des chaîne de calmoduline se détache, sans effet sur l'activité ATPase. A 37°C , l'effet est très différent. Même à une concentration inférieure à 10^{-7} M de Ca^{2+} , une molécule de calmoduline se dissocie. A 10^{-6} M, 1,5 molécule de calmoduline de plus se dissocie (en moyenne!), et il n'y a plus d'effet jusqu'à 10^{-3} M. La dissociation de la calmoduline s'accompagne d'une perte totale d'activité ATPase dépendant de l'actine [Swanlung-Collins and Collins, 1994]. La dissociation d'une molécule de calmoduline

peut donc réguler l'activité de BBMI. Cependant, les ions Ca^{2+} peuvent aussi la réguler sans nécessiter l'action de la calmoduline comme c'est le cas à 30 °C.

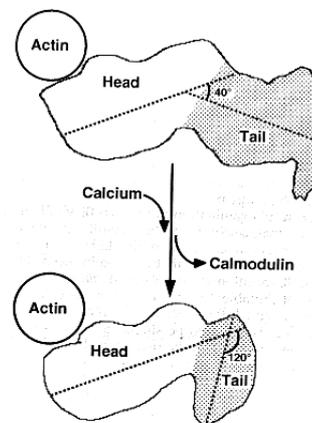


FIG. I.1.13: Changement de conformation de BBMI dû à la dissociation d'une molécule de calmoduline sous l'effet du calcium (D'après [Whittaker and Milligan, 1997]).

Plusieurs auteurs ont observé une inhibition totale de l'activité ATPase dépendant de l'actine et du mouvement de BBMI pour une concentration en ions Ca^{2+} supérieure à 10^{-5} M [Swanlung-Collins and Collins, 1991, Whittaker and Milligan, 1997]. Whittaker et coll. ont montré que la perte d'une molécule de calmoduline entraînait un changement de conformation de BBMI visible par une réorganisation des chaînes moléculaires formant la queue de la protéine. Celle-ci passe d'une forme ovoïde d'une taille d'environ 6 nm en présence de calcium à une forme plus allongée, agrandie de 2 nm. Ceci s'additionne d'un changement de l'angle entre la queue et la tête de la myosine de 40° à 120° (Voir figure I.1.13) [Whittaker and Milligan, 1997].

Le calcium influe également sur la liaison de BBMI aux phospholipides. Swanlung-Collins et coll. ont mesuré un fort accroissement de la liaison de BBMI à la phosphatidylsérine lorsque la concentration en ions Ca^{2+} dépasse $1 \mu\text{M}$, en même temps que la dissociation de trois calmodulines sur quatre [Swanlung-Collins and Collins, 1991].

Suite à ces résultats, les auteurs ont proposé un modèle de régulation de l'association de BBMI à la membrane par le calcium, résumé sur la figure I.1.14.

Un autre rôle du calcium est la régulation de la phosphorylation¹⁵ de BBMI. En effet, BBMI est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), supposée intervenir dans la régulation de nombreux phénomènes cellulaires et présente, entre autres, dans le cytoplasme et la bordure en brosse des entérocytes. La phosphorylation a lieu sur la sérine et la thréonine, sur des sites situés à environ 20 kD de l'extrémité carboxy-terminale de BBMI. Cependant, on ne connaît

¹⁵Réaction de fixation d'un groupement phosphate à une molécule, pouvant entraîner un changement de conformation de celle-ci. C'est une réaction très importante pour la régulation de nombreux événements cellulaires.

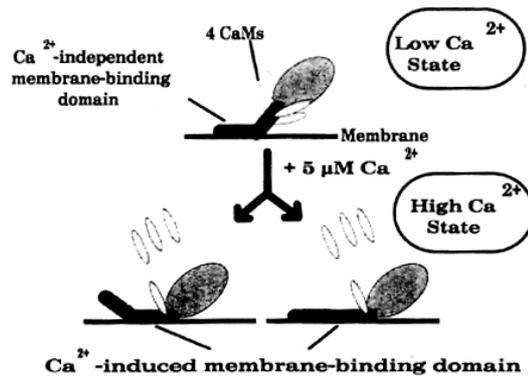


FIG. I.1.14: **Modèle de la régulation de la liaison de BBMI aux phospholipides par le calcium.** (D'après [Swanljung-Collins and Collins, 1991])

pas leur nombre et leur localisation exacte. L'activité de la PKC est dépendante de la concentration calcique, avec un pic d'activité maximale vers une concentration de Ca²⁺ de 3 μM. Elle est également dépendante de la présence de phosphatidylsérine et des expériences complémentaires montrent que la phosphorylation ne se produit que lorsque BBMI est liée à des vésicules de phosphatidylsérine [Swanljung-Collins and Collins, 1992, Collins and Swanljung-Collins, 1992].

Il convient de noter que la phosphorylation de BBMI n'a pas lieu suivant la «TEDS rule» contrairement à la majorité des autres myosines I [Bement and Mooseker, 1995]. En effet, celles-ci sont phosphorylées dans une région très conservée de la séquence, dans le domaine moteur de la protéine, ce qui active l'activité ATPase de la myosine. De plus, les autres myosines I sont généralement phosphorylées par d'autres kinases, comme les HCK (Heavy Chain Kinase) [Brzeska and Korn, 1996].

Les tropomyosines sont une famille de protéines de liaison à l'actine, présentes dans de nombreux types cellulaires. Elles sont connues pour réguler l'interaction des myosines des muscles striés avec l'actine. Il a été montré en utilisant différentes tropomyosines non musculaires qu'elle inhibent toutes l'activité MgATPase de BBMI de 75 à 90 % alors que seule une partie d'entre-elles inhibent l'activité de la myosine II musculaire de 70 à 85 % (valeur comparable à celle observée avec des tropomyosines musculaires). De plus, un des isoformes stimule l'activité de la myosine II et inhibe de la même façon l'activité de BBMI. La motilité de BBMI est complètement inhibée par tous les isoformes [Fanning et al., 1994]. On voit que les tropomyosines peuvent réguler l'activité de BBMI, tout en permettant à d'autres myosines de fonctionner, voir en les stimulant. Cela indique que les modes de fonctionnement possibles de BBMI et de la myosine II sont très différents.

La «zipper-protein», protéine homologue à la tropomyosine, régule elle aussi l'activité de BBMI *in vitro*. Elle est localisée dans les microvillosités, étroitement associée à la membrane plasmique et à BBMI. Elle a la faculté de bloquer la liaison de BBMI à l'actine comme la

tropomyosine, probablement par compétition pour le même site d'accrochage. De plus, elle peut inhiber totalement l'activité ATPase de BBMI activée par l'actine, mais pas son activité en absence d'actine [Bikle et al., 1996]. Cette protéine pourrait donc servir *in vivo* à réguler la liaison de BBMI à l'actine et sa mobilité.

Rôle de BBMI dans les cellules

BBMI a été la première myosine non-conventionnelle découverte chez les vertébrés et ses propriétés ont été beaucoup étudiées, en particulier *in vitro*.

Pourtant, son rôle dans les cellules épithéliales de l'intestin reste peu connu et peu d'études ont été faites *in vivo* pour comprendre sa fonction malgré les nombreuses hypothèses émises à partir des résultats obtenus *in vitro*. Il a été suggéré, par exemple, qu'elle pourrait intervenir dans l'organisation des filaments d'actine lors de la formation de la bordure en brosse, mais, comme nous l'avons vu précédemment, BBMI n'est localisée dans les microvillosités qu'après les autres protéines et notamment après que le faisceau de filaments d'actine ne soit formé et stabilisé. Ce résultat semble également infirmer la première hypothèse évoquée, car il n'a pas été observé de déformation particulière de la membrane plasmique dans les stades de développement où la BBMI est absente. Il est donc très improbable qu'elle soit nécessaire au maintien de la tension membranaire. Une autre hypothèse est qu'elle serait présente dans les microvillosités pour maintenir une tension constante de la membrane plasmique et empêcher qu'elle ne se «boursoufle» vers la lumière de l'intestin.

Suite à leurs observations sur la localisation de BBMI dans des membranes golgiennes extraites d'entérocytes, Fath et coll. ont suggéré qu'elle permettrait le transport des vésicules golgiennes à travers le plateau terminal, jusqu'à la membrane plasmique [Fath et al., 1994]. En effet, leurs expériences montrent la présence de BBMI dans ces membranes obtenues par fractionnement de cellules épithéliales d'intestin de poulet, ainsi que la présence de dynéine dans une partie des membranes correspondant probablement au réseau trans-golgien. Les fractions contenant à la fois de BBMI et de la dynéine sont capables de se lier aux microtubules et aux filaments d'actine, ce qui est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la dynéine transporterait les vésicules golgiennes du Golgi jusqu'au bas du plateau terminal où les microtubules s'arrêtent, puis BBMI prendrait le relai jusqu'à la membrane plasmique. Cependant, l'enrichissement des membranes golgiennes en BBMI n'est pas très élevé et pourrait être dû à une contamination par des molécules de BBMI provenant des microvillosités. De plus, l'organisation des filaments d'actine dans le réseau terminal est plutôt perpendiculaire à l'axe de polarité des cellules et il n'y en a pas entre les racines des microvillosités [Drenckhahn and Dermietzel, 1988], ce qui ne fournit pas de support au mouvement de BBMI vers la membrane plasmique. Il faudrait que les vésicules soient acheminées jusqu'aux racines des microvillosités, où BBMI a été détectée [Drenckhahn and Dermietzel, 1988], par un autre moyen, les microtubules étant absents de cette région.

Les seules expériences portant sur la fonction de BBMI *in vivo* ont été menées par Durrbach et coll., et indiquent un rôle possible pour la BBMI dans le trafic intracellulaire. En effet, les auteurs ont d'abord observé que l'expression de domaines non-fonctionnels de BBMI dans une lignée cellulaire d'hépatome (cellules non-polarisées n'exprimant pas BBMI) entraînait une perturbation de la distribution et de la fonction des compartiments d'endocytose. De plus, il apparaît que la séquence amino-terminale comportant le site de liaison à l'ATP soit nécessaire pour que BBMI soit colocalisée avec les structures de la surface cellulaire contenant de l'actine [Durrbach et al., 1996]. D'autres expériences, menées cette fois dans des cellules de culture Caco-2 (dérivées d'entérocytes, donc polarisées et exprimant BBMI), ont montré que l'expression de ces mêmes domaines non-fonctionnels affectait le recyclage et le transport intracellulaire de la transferrine et le transport transépithélial de la dipeptidyl-peptidase IV de la membrane basolatérale vers la membrane apicale. Leur expression perturbe également la distribution dans les endosomes apicaux des marqueurs de phase fluide internalisés à la membrane basolatérale, ainsi que les molécules internalisées par endocytose induite par des récepteurs. Ces résultats peuvent être interprétés en considérant que les formes tronquées de BBMI entrent en compétition avec les molécules de BBMI endogène ou une myosine I homologue. Plus précisément, il semble que BBMI ou une autre myosine I régule la fusion des endosomes basolatéraux avec les endosomes apicaux en contrôlant la liaison des endosomes aux filaments d'actine de façon ATP-dépendante. En effet, BBMI Δ 446, qui ne comporte pas de site de liaison de l'ATP, maintiendrait les endosomes liés aux filaments d'actine et les empêcherait de fusionner avec les endosomes apicaux. A l'inverse, BBMI Δ 730, qui ne comporte plus que la queue de BBMI, ne se lie pas aux filaments d'actine et ne retient pas les endosomes. Ceux-ci peuvent alors fusionner librement avec la membrane plasmique. Cela suggère que BBMI ou une myosine I semblable contrôle le transport des molécules internalisées vers les endosomes apicaux via le contrôle de la fusion des endosomes [Durrbach et al., 2000].

Néanmoins, ces expériences n'indiquent pas quelle fonction pourrait remplir BBMI dans la bordure en brosse où elle est pourtant particulièrement abondante. De plus, aucune étude de la dynamique moléculaire de BBMI n'a été faite dans des cellules vivantes. Plusieurs questions restent en suspens : est-ce que BBMI est mobile dans les microvillosités ? Son mouvement éventuel est-il dirigé ? Est-elle liée à des endosomes ? à la membrane plasmique ? La connaissance de la dynamique de BBMI nous permettrait également de mieux comprendre la dynamique de la bordure en brosse dans son ensemble et, par conséquent, des phénomènes d'échange avec le milieu extracellulaire, particulièrement important dans ces cellules.

Chapitre I.2

Objectifs de cette étude

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la fonction biologique de BBMI dans la bordure en brosse des entérocytes n'est pas encore connue. De plus, BBMI et les principales autres protéines de la bordure en brosse ont été peu ou pas étudiées d'un point de vue dynamique. Nous nous proposons donc dans ce travail d'étudier la dynamique de BBMI et son interaction avec le reste du cytosquelette, en particulier avec l'actine qui est très probablement son partenaire privilégié d'après les expériences déjà faites *in vitro*. Ceci pourrait nous éclairer sur le rôle de BBMI dans la dynamique de la bordure en brosse.

En particulier, nous souhaitons répondre aux questions suivantes :

- BBMI a-t-elle un mouvement dans la bordure en brosse ?
- BBMI a-t-elle une activité motrice dans cette région de la cellule ?
- l'actine est-elle mobile dans les microvillosités ?
- s'il y a mouvement de l'actine et de BBMI, sont-ils corrélés ?

Pour apporter une réponse à ces questions, il a fallu mettre au point un dispositif expérimental permettant la mesure de la mobilité des protéines dans une région restreinte de la cellule par la combinaison de la FRAP et de la microscopie à deux photons.

Chapitre I.3

Principes physiques et méthodes expérimentales

Pour mesurer la mobilité d'une molécule et, par exemple, déterminer son coefficient de diffusion, les deux principales techniques utilisées en microscopie sont la spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy)¹ et la mesure du retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching). Cette méthode consiste à «éteindre» les molécules fluorescentes dans une région définie, puis à mesurer le retour de fluorescence dû au retour éventuel de molécules non éteintes dans la région. La première technique est bien adaptée dans les systèmes comportant une densité faible de molécules fluorescentes, mais dans notre cas la concentration est trop importante et il est préférable d'utiliser la seconde. De plus, la FCS est plus sensible à la fluorescence intrinsèque des protéines présentes dans les cellules. Cette grande sensibilité, tant à la concentration qu'aux autres sources de fluorescence rend cette technique délicate à utiliser dans des cellules vivantes [Berland et al., 1995].

La FRAP, très utilisée en microscopie classique, doit cependant être adaptée pour notre étude. En effet, nous souhaitons étudier la dynamique des protéines dans une région restreinte et d'une forme tridimensionnelle complexe, la bordure en brosse, qui fait environ 2 μm de hauteur. La FRAP, telle qu'elle est pratiquée habituellement, ne permet des mesures qu'en deux dimensions comme nous le verrons plus loin, ce qui ne convient pas du tout pour notre modèle expérimental qui est tridimensionnel. Pour cela, il nous faut une technique fournissant une mesure locale de la fluorescence, sans perturber le reste de la cellule. La microscopie à deux photons permet de mesurer la fluorescence dans un volume inférieur au μm^3 et de faire de l'imagerie tridimensionnelle. Nous avons donc combiné cette technique avec la FRAP pour étudier la mobilité des protéines localement.

¹Cette technique est basée sur la mesure des fluctuations du nombre de molécules fluorescentes dans un volume défini. Pour cela, on calcule la fonction d'autocorrélation de l'intensité de fluorescence mesurée dans le volume. Avec un modèle adéquat, on peut remonter à la valeur du coefficient de diffusion, par exemple.

Nous commencerons donc ce chapitre en exposant le principe de l'excitation à deux photons de molécules fluorescentes et son application à la microscopie. Nous aborderons ensuite la technique de FRAP en excitation à un photon, puis en excitation à deux photons.

I.3.1 La microscopie à deux photons

I.3.1.1 La fluorescence en excitation à deux photons

Rappel sur la fluorescence classique

Lorsqu'une molécule fluorescente absorbe un photon dont l'énergie $h\nu$ est égale à la différence d'énergie entre le niveau électronique fondamental et un niveau électronique de plus haute énergie, elle subit une transition électronique vers cet état électronique excité. Elle peut ensuite se désexciter spontanément en émettant un autre photon d'énergie un peu plus faible, et donc de longueur d'onde plus grande, à cause des pertes internes ², notamment d'origine vibrationnelle, en général beaucoup plus rapides que le processus de désexcitation radiative (de l'ordre de 10^{-12} contre 10^{-9}). Ce phénomène est appelé fluorescence. Ce processus est illustré sur la figure I.3.1.

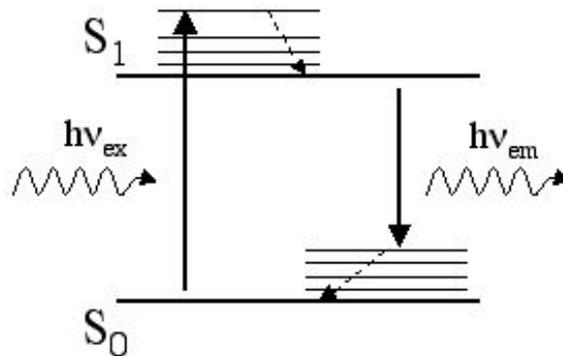


FIG. I.3.1: Diagramme dit «de Jablonski» illustrant le phénomène de fluorescence en excitation à un photon. ν_{ex} : fréquence de la lumière d'excitation, ν_{em} : fréquence de la lumière émise, S_0 : niveau électronique fondamental, S_1 : premier niveau électronique excité.

Dans un flux de photons donné, une molécule a une probabilité d'être excitée du niveau électronique fondamental à un niveau électronique excité. Cette probabilité dépend de la section efficace et du flux incident : $p_{exc} \sim \phi_{exc} \sigma_1(\lambda)$, où ϕ_{exc} désigne le flux de photons et σ_1 la section efficace de la molécule en excitation à un photon. Cette dernière dépend de la longueur d'onde de la lumière incidente (donc de l'énergie des photons incidents) car la transition électronique peut se faire entre différents niveaux avec une efficacité différente. La connaissance de la section efficace en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente donne le spectre

²C'est le décalage de Stokes qui explique qu'une molécule fluorescente verte doit être excitée par de la lumière bleue, plus énergétique.

d'excitation de la molécule. La figure I.3.2 montre un exemple de spectre d'excitation d'une molécule fluorescente. L'ordre de grandeur de la section efficace à un photon est : $\sigma_1 = 10^{-16}$ cm², ce qui correspond à environ 1 Å² soit la surface typique d'un atome.

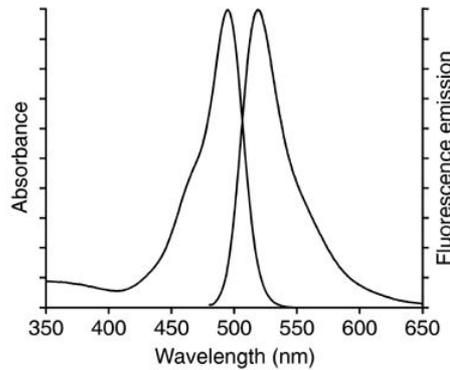


FIG. I.3.2: Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) typiques d'une molécule fluorescente. Chaque spectre possède un pic en intensité, le pic d'émission étant décalé vers les grandes longueurs d'onde (décalage de Stokes).

Le nombre de photons absorbés par unité de temps est proportionnel au flux de la lumière d'excitation :

$$N_{abs} \propto \sigma_1(\lambda) \phi_{exc}.$$

Néanmoins, la molécule excitée n'émet pas systématiquement un photon de fluorescence car il existe d'autres voies par lesquelles la molécule peut perdre l'énergie acquise (nous y reviendrons par la suite). On définit donc un rendement quantique de fluorescence (*QY* : *quantum yield*), noté η_1 , comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Pour la fluorescéine, ce rendement quantique vaut environ 0,9 [Demas and Crosby, 1971].

D'un point de vue temporel, la durée de vie du niveau excité est de l'ordre de 1 ns. Ceci entraîne un découplage entre l'émission et l'excitation car la molécule peut avoir pendant ce temps des échanges d'énergie avec d'autres systèmes et se retrouver dans l'état excité le moins énergétique. La forme du spectre d'émission est donc différent du spectre d'excitation avec un pic décalé vers les grandes longueurs d'onde à cause des pertes d'énergie internes. La figure I.3.2 montre la forme typique du spectre d'émission d'une molécule fluorescente.

De plus, la molécule dans son état excité peut réagir avec son environnement, avec d'autres molécules ou ions, ceci d'autant plus que la température est élevée et la concentration de l'autre espèce élevée. L'émission de fluorescence est donc souvent sensible à l'environnement de la molécule. C'est le cas, par exemple, de la fluorescéine dont le spectre d'émission varie en fonction du pH comme on le voit sur la figure I.3.3.

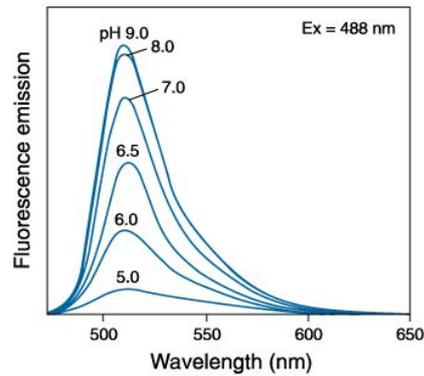


FIG. I.3.3: Spectre d'émission de la fluorescéine pour différentes valeurs du pH. L'intensité d'émission de fluorescence diminue avec le pH, avec un léger changement de longueur d'onde du pic d'intensité maximale.

L'excitation à deux photons

Le processus de fluorescence peut également se produire si à la place d'un seul photon d'énergie $h\nu$, deux photons d'énergie moitié $\frac{h\nu}{2}$ sont absorbés par la molécule³. D'un point de vue «mécanistique», le premier photon excite la molécule jusque dans un état virtuel de durée de vie d'environ 10^{-16} s, le second photon doit donc arriver «sur» la molécule dans cet interval de temps, et exciter la molécule vers un état excité réel (c'est-à-dire correspondant à un niveau électronique de la molécule). Ensuite, la molécule se désexcite en émettant un photon de la même façon que dans le cas précédent car la transition électronique lors de la désexcitation a lieu entre des niveaux d'énergie identiques.

Ce processus de fluorescence en excitation à deux photons est illustré sur la figure I.3.4.

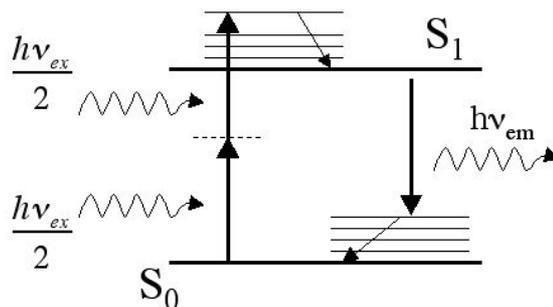


FIG. I.3.4: Diagramme de Jablonski illustrant le phénomène de fluorescence en excitation à deux photons. ν_{ex} : fréquence de la lumière d'excitation en excitation à un photon, ν_{em} : fréquence de la lumière émise, S_0 : niveau électronique fondamental, S_1 : premier niveau électronique excité.

La probabilité d'excitation à deux photons est nettement plus faible que dans le cas précédent. En effet, la section efficace à deux photons peut s'écrire : $\sigma_2 \approx \sigma_1 \sigma_1 \Delta t$, où Δt est le temps

³Ce phénomène a été prédit théoriquement dès 1931 par Maria Göppert-Mayer [Göppert-Mayer, 1931] et fut démontré expérimentalement en 1961 [Kaiser and Garrett, 1961].

de coïncidence des deux photons. L'ordre de grandeur de la section efficace à deux photons est d'environ $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$. On utilise une unité plus pratique : le Göppert-Mayer (ou GM) égale à $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$. Cette fois, le nombre de photons absorbés par unité de temps n'est plus proportionnel à l'intensité de la lumière d'excitation, mais au carré de l'intensité :

$$N_{abs} \propto \sigma I_{exc}^2.$$

Nous verrons plus loin les conséquences importantes de cette excitation non-linéaire et son utilisation en microscopie.

Comme dans le cas de l'excitation à un photon, la section efficace à deux photons dépend de la longueur d'onde de la lumière d'excitation. La figure I.3.5 montre le spectre à deux photons de différentes molécules fluorescentes usuelles.

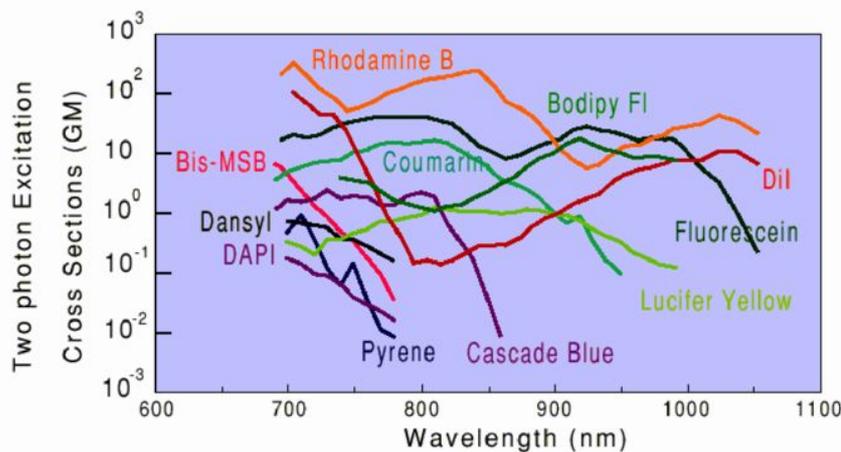


FIG. I.3.5: Spectre d'excitation à deux photons de quelques fluorophores courants [Xu et al., 1996].

On remarque tout de suite que la gamme de longueurs d'onde excitant les fluorophores est dans le proche infrarouge et non dans le visible. En effet, les deux photons absorbés doivent avoir au moins une énergie moitié de celle de l'unique photon absorbé en excitation à un photon, c'est-à-dire une longueur d'onde double d'après la relation $E = h\nu = hc/\lambda$ où ν est la fréquence, c , la célérité de la lumière dans le vide et λ , la longueur d'onde. Les fluorophores usuels émettant dans le visible (400-650 nm), il faut donc une source excitatrice dans le proche infra-rouge (700-1000 nm) pour que l'absorption de deux photons soit possible.

Cependant, il faut noter que le pic du spectre d'excitation à deux photons n'est pas systématiquement situé au double de la longueur du pic d'excitation à un photon. Il est souvent décalé vers le bleu, c'est-à-dire les faibles longueurs d'onde. Cela peut s'expliquer en supposant que les molécules sont plus facilement excitées dans des états d'énergie plus grande en excitation à deux photons qu'en excitation à un photon. La figure I.3.6 montre les spectres d'excitation à un et deux photons de la fluorescéine, du DiI et de la rhodamine B.

Une conséquence de la forme des spectres d'excitation à deux photons est que l'on peut exciter plusieurs fluorophores avec une seule longueur d'onde et donc visualiser simultanément

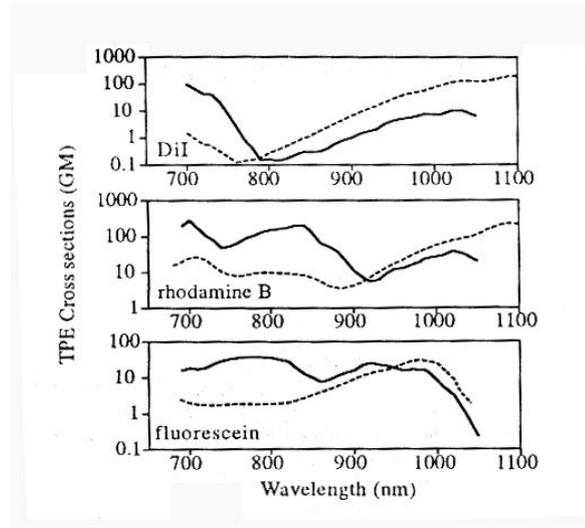


FIG. I.3.6: Comparaison entre les spectres d'excitation en un (en pointillés) et deux photons de trois fluorophores courants [Xu and Webb, 1996].

des marquages multiples (jusqu'à quatre [Xu et al., 1996]). Cette propriété de la fluorescence en excitation à deux photons permet des études nouvelles, par exemple le suivi simultané du mouvement des différents partenaires moléculaires lors du déroulement d'un processus biologique donné. On peut ainsi envisager de nombreuses expériences biologiques inédites.

Les spectres d'émission sont par contre identiques dans les deux modes d'excitation. On peut le voir sur la figure I.3.7 où est représenté le spectre d'émission de la fluorescéine en excitation à un et deux photons [Xu and Webb, 1996]. On considère également que le rendement de fluorescence est identique à un et deux photons à cause du découplage entre l'excitation et l'émission du fait de la durée de vie relativement grande du niveau électronique à partir duquel se fait la désexcitation.

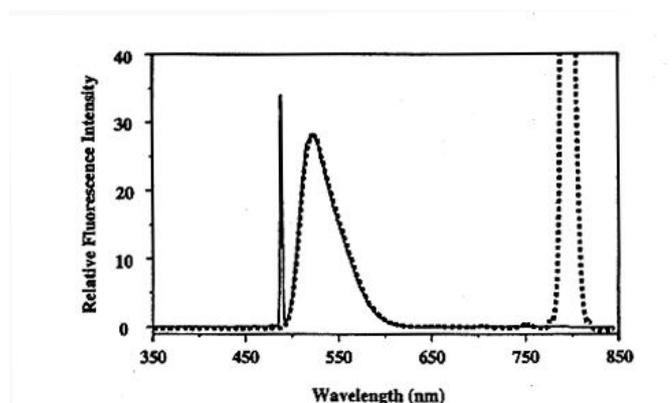


FIG. I.3.7: Comparaison entre les spectres d'émission en excitation à un (trait continu) et deux (pointillés) photons de la fluorescéine [Xu and Webb, 1996].

I.3.1.2 Principe d'un microscope à deux photons

L'application à la microscopie laser à balayage de l'excitation à deux photons a vu le jour en 1990 grâce à Denk et coll. [Denk et al., 1990]. Nous allons voir comment appliquer l'excitation à deux photons pour former l'image d'un échantillon fluorescent, et quelles sont les propriétés fondamentales d'un microscope à deux photons.

Imagerie

Un échantillon fluorescent peut être décrit comme une distribution tridimensionnelle de fluorophores. Pour en faire une image, il faut d'abord exciter les molécules fluorescentes pour qu'elles émettent des photons qu'on puisse ensuite collecter. En excitation à un photon, le flux de photon nécessaire à l'excitation est suffisamment faible pour que l'on puisse exciter une région étendue de l'échantillon avec une source de lumière classique (lampe au mercure, laser continu). En excitation à deux photons, la section efficace est nettement plus faible ($10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$ contre 10^{-16} cm^2 en un photon) et il faut donc utiliser un flux beaucoup plus grand. Ceci ne s'obtient qu'avec une source laser focalisée spatialement et temporellement. Il faut donc concentrer la lumière spatialement, en la focalisant fortement à l'aide d'un objectif, et temporellement, en utilisant une source de lumière pulsée.

En pratique, on utilise comme source de lumière excitatrice un laser pulsé, avec des impulsions d'une largeur temporelle d'environ 70-100 fs et une fréquence de répétition de 80 MHz. Pour une puissance moyenne de 10 mW, on obtient une puissance crête de $P_{\text{crête}} = \frac{P_{\text{moy}}}{f \times \tau} = \frac{10}{80 \cdot 10^6 \times 100 \cdot 10^{-15}} \approx 1200 \text{ W}$. On comprend tout l'intérêt de l'utilisation d'un laser femtoseconde !

Dans le cas d'une source pulsée, le nombre de photons absorbés par unité de temps est alors donné par la relation suivante :

$$N_{\text{abs.}} \propto \frac{P_{\text{exc.}}^2}{\tau_{\text{pulse}}}$$

On voit par cette relation, encore une fois, que l'on a intérêt à utiliser des impulsions les plus courtes possibles, ce qui se conçoit bien pour obtenir l'absorption «simultanée» de deux photons.

Une conséquence immédiate de la focalisation de la lumière est qu'il faut «balayer» l'échantillon avec le faisceau laser focalisé pour en faire une image, c'est-à-dire qu'il faut déplacer le faisceau laser point par point et collecter la fluorescence de chacun de ces points pour former l'image. Le principe du balayage est illustré sur la figure I.3.8.

Localisation de l'excitation

Nous avons vu précédemment que le nombre de photons absorbés, et donc le nombre de photons émis par fluorescence, est proportionnel au carré de l'intensité de la lumière d'ex-

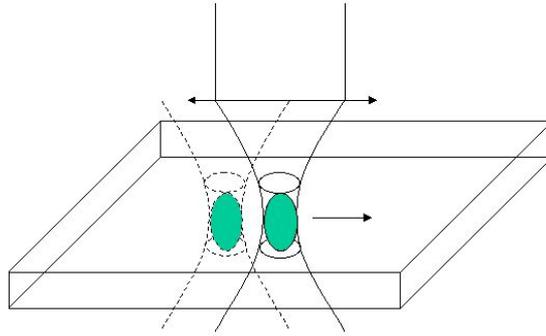


FIG. I.3.8: Principe du balayage de l'échantillon par le faisceau laser pour la formation d'une image. Le faisceau se déplace dans la direction indiquée et le signal de fluorescence est mesuré à chaque point, ce qui permet de reconstruire la distribution des fluorophores dans l'échantillon.

citation en l'absence de saturation de l'excitation. Ceci a une implication importante sur la distribution des molécules excitées dans l'échantillon.

En effet, dans le cas de l'excitation à un photon, le nombre de photons absorbés dans un élément de volume dV s'écrit :

$$d^3 N_{abs}^1 = \sigma_1 C(r, t) I(r, t) dV,$$

où $C(r, t)$ est la concentration en fluorophores de l'échantillon et $I(r, t)$ est la distribution de l'intensité de la lumière d'excitation. En faisant l'hypothèse que le faisceau laser focalisé est Gaussien-Lorenzien, on peut écrire l'intensité comme :

$$I(r) = I_0 \frac{w_0^2}{w(z)^2} \exp[-2r^2/w(z)^2],$$

avec $w(z)^2 = w_0^2(1 + z^2/z_0^2)$. En remplaçant dans l'équation précédente et en supposant une concentration uniforme de fluorophores, on obtient :

$$d^3 N_{abs}^1 = \sigma_1 C I_0 \frac{w_0^2}{w(z)^2} \exp[-2r^2/w(z)^2] r d\theta dr dz.$$

En intégrant par rapport à r et θ , on a :

$$dN_{abs}^1 = 2\pi\sigma_1 C I_0 \frac{w_0^2}{4} dz.$$

On voit donc que le nombre de photons absorbés dans une «tranche» de hauteur dz est constante. L'absorption (et donc l'excitation) sera la même dans les tranches perpendiculaires à l'axe optique quelque soit sa position le long de l'axe. La localisation de l'excitation est aisément démontrée expérimentalement comme on le voit sur la figure I.3.9.

Dans le cas de l'excitation à deux photons, le nombre de photons absorbés dans l'élément de volume s'écrit : $d^3 N_{abs}^2 = \sigma_2 C(r, t) I(r, t)^2 dV$. En suivant le même calcul que précédemment, on obtient finalement :

$$dN_{abs}^2 = 2\pi\sigma_2 C I_0^2 \frac{w_0^4}{8w(z)^2} dz,$$

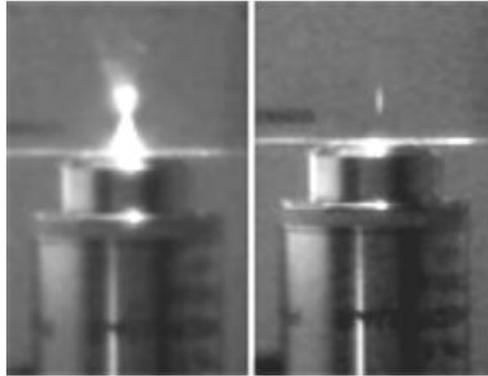


FIG. I.3.9: **Démonstration expérimentale de la localisation de l'excitation.** A gauche, dans le cas de l'excitation à un photon, on voit le cône émergent de l'objectif. A droite, en excitation à deux photons, on ne voit qu'un petit volume excité.

soit, en explicitant $w(z)$:

$$dN_{abs}^2 = 2\pi\sigma_2 C I_0^2 \frac{w_0^4}{8(1+z^2/z_0^2)} dz.$$

Cette fois, le nombre de photons varie en $1/(1+z^2)$, ce qui implique que l'intégrale de ce terme converge (reste finie quelque soit le domaine d'intégration) et, par conséquent, que l'excitation est localisé en z . L'utilisation de l'excitation à deux photons permet donc, en balayant le faisceau laser dans l'échantillon à z fixé, de faire l'image d'un plan de l'échantillon.

Profil d'excitation : PSF

Nous venons de voir que l'excitation des fluorophores dans l'échantillon est localisée suivant l'axe optique. Quand on utilise, de plus, un objectif de microscope à forte ouverture numérique (*N.A. : numerical aperture*) pour concentrer la lumière laser spatialement, l'excitation n'a lieu qu'au foyer de l'objectif. Elle est ainsi localisée dans un petit volume de l'ordre du μm^3 . La distribution de l'intensité au voisinage du foyer est appelée PSF, de l'anglais *Point Spread Function*. Elle décrit effectivement la façon dont est imagée une source ponctuelle à travers l'objectif. Le fait que la source paraît élargie à travers l'objectif est dû à l'effet de la diffraction de la lumière.

La forme exacte de la PSF à deux photons n'est calculable que numériquement, cependant, une bonne approximation est donnée par une gaussienne :

$$PSF_{radiale} = \exp\left[-4\left(\frac{r}{\sigma_r}\right)^2\right], \quad PSF_{axiale} = \exp\left[-4\left(\frac{z}{\sigma_z}\right)^2\right],$$

où σ_r et σ_z sont les largeurs totales à $1/e$, dépendant de la valeur de l'ouverture numérique.

On peut en déduire le volume d'excitation [Mertz, 1998] :

$$V_{2photons} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} \sigma_r^2 \sigma_z.$$

On voit donc que la microscopie à deux photons permet une mesure de la concentration d'un fluorophore dans un faible volume défini par la PSF du microscope.

Résolution

La résolution d'un microscope est définie classiquement comme la distance minimale entre deux points que l'on peut distinguer sur une image.

L'expression des résolutions axiale et radiale du microscope, pour un objectif de demi-angle d'ouverture α et un milieu d'immersion d'indice n est donnée par les formules suivantes :

$$\sigma_r = 1,055 \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \text{ et } \sigma_z = 0,1905 \frac{2\lambda}{n \sin^2 \alpha/2},$$

pour une ouverture numérique ($N.A. = n \sin \alpha$) comprise entre 0,9 et 1,2.

Pour un objectif à immersion à eau, d'ouverture numérique 1,2 et $\lambda = 780 \text{ nm}$, on a les valeurs théoriques suivantes : $\sigma_r = 0,349 \mu\text{m}$, $\sigma_z = 0,800 \mu\text{m}$ et $V_{2\text{photons}} = 0,19 \text{ fl}$ (ref laurent).

Collecte de la fluorescence

Une fois excités, les fluorophores émettent de la fluorescence d'un seul «point» à la fois, qu'il faut collecter pour obtenir une image de l'échantillon. Pour cela, on utilise le plus souvent le même objectif pour focaliser le faisceau laser dans l'échantillon et collecter la fluorescence. La collecte est donc restreinte à la portion de fluorescence émise suivant un angle solide de $2\alpha = 2a \sin(N.A./n)$, en supposant que l'émission est isotrope. La fluorescence est ensuite séparée de la lumière laser par des filtres chromatiques, puis son intensité est mesurée à l'aide d'un détecteur, par exemple, un photomultiplicateur.

Pour une concentration de fluorophores $C(\vec{r}, t)$, la fluorescence collectée peut s'écrire :

$$I_{flu.}(t) = \frac{1}{2} \phi \eta_2 \sigma_2 \int_V C(\vec{r}, t) I_{exc.}^2(\vec{r}, t) dV,$$

où ϕ est l'efficacité de collection du système expérimental (et ne désigne pas un flux ici), η_2 , l'efficacité quantique de fluorescence à deux photons et σ_2 , la section efficace d'absorption à deux photons.

La fluorescence mesurée est donc proportionnelle à la concentration des molécules fluorescentes dans l'échantillon et peut refléter les éventuelles variations de concentration, toujours dans la limite où aucune saturation de l'excitation n'a lieu.

I.3.1.3 Avantages et applications

L'intérêt majeur de la microscopie à deux photons est la possibilité de faire des «coupes optiques» d'un échantillon en n'excitant seulement le plan focal, et non sur toute l'épaisseur comme en microscopie «classique». On peut ensuite obtenir une reconstruction tridimensionnelle de l'échantillon avec un logiciel de traitement d'image. La microscopie confocale permet également de faire des coupes optiques, et nous allons comparer ces deux techniques.

Comparaison avec la microscopie confocale

Le principe de fonctionnement d'un microscope confocal est basé sur le filtrage spatial de la lumière provenant de l'échantillon. Concrètement, on place un petit trou (*pinhole*) conjugué avec le foyer de l'objectif devant le détecteur de fluorescence. Dans ce cas, seule la lumière provenant directement du foyer pourra atteindre le détecteur, les autres photons étant perdus. Ce principe est illustré sur la figure I.3.10. En microscopie à deux photons, ce filtrage est inutile car on sait que toute la fluorescence détectée provient du volume d'excitation, en particulier même les photons ayant subi de la diffusion dans un échantillon épais peuvent être détectés. Il est également inutile de «descanner» la fluorescence et on peut placer les détecteurs le plus près possible de l'échantillon. Ces deux avantages augmentent l'efficacité de collection de la fluorescence et permettent de faire des images plus profondément dans les échantillons diffusants (par exemple, un tissu biologique). La profondeur atteignable est encore augmentée grâce à la longueur d'onde de la lumière d'excitation utilisée en excitation à deux photons, le proche infrarouge, plus pénétrante que la lumière visible.

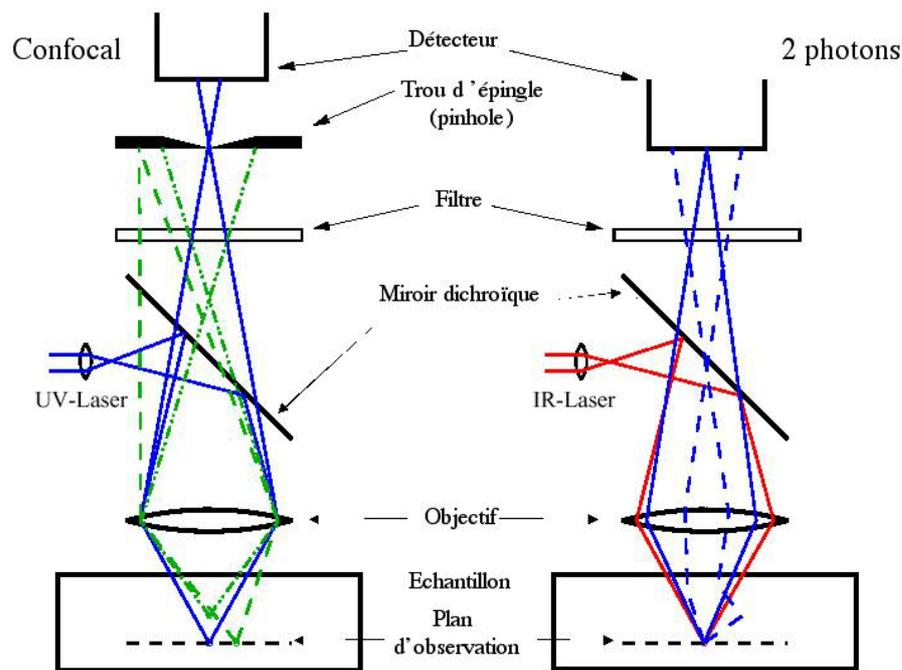


FIG. I.3.10: Comparaison du principe instrumental de la microscopie confocale (gauche) et de la microscopie à deux photons (droite) [Fricke, 2000].

L'écart entre la longueur d'onde de la lumière absorbée et celle de la lumière émise apporte un autre avantage à la microscopie à deux photons. En effet, dans ce cas, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont très différentes ce qui permet facilement d'éliminer toute lumière parasite provenant du laser. A l'inverse, cet écart (appelé décalage de Stokes⁴) est faible en excitation à un photon et il n'est pas toujours facile en microscopie confocale d'allier sélec-

⁴C'est ce qui explique qu'une molécule fluorescente verte doit être excitée par de la lumière bleue.

tion chromatique de la fluorescence et efficacité de collection.

Un autre avantage décisif de la microscopie à deux photons découle directement de la localisation de l'excitation. En effet, comme nous le verrons au sujet de la FRAP, lorsqu'on excite un fluorophore, il y a une certaine probabilité qu'il soit photoblanchi. Dans le cas de la microscopie confocale, l'excitation n'étant pas localisée, tout le cône de lumière émergeant de l'objectif excite les fluorophores et induit potentiellement du photoblanchiment dans ce même cône, notamment lors de l'acquisition d'une série d'images dans le même plan ou dans des plans proches⁵. En microscopie à deux photons, l'excitation n'a lieu qu'à l'endroit observé et, par conséquent, il n'y a pas de photoblanchiment dans le reste de l'échantillon. Une conséquence capitale est la réduction de la phototoxicité, rendant possible l'observation prolongée d'échantillons fragiles comme des embryons.

La figure I.3.11 montre l'effet du photoblanchiment pour les deux types de microscope. Seule la région délimitée par le rectangle blanc est réellement observée, et toute la fluorescence générée hors de ce plan est perdue avec autant de phototoxicité inutile.

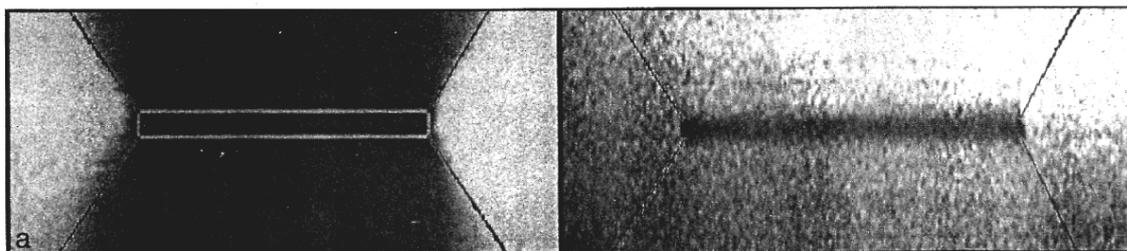


FIG. I.3.11: Comparaison du photoblanchiment en microscopie confocale (gauche) et en microscopie à deux photons (droite) [Piston et al., 1994].

Utilisation en biologie

Les applications de la microscopie à deux photons en biologie sont très nombreuses et variées. On peut généralement les classer en deux catégories : les utilisations pour l'imagerie et les utilisations pour des mesures ou des actions locales : mesure de concentration, de durée de vie, de spectre d'émission, FCS ou encore photoactivation de fluorophores.

En imagerie, on peut utiliser cette technique de la même façon que la microscopie confocale, pour faire des coupes optiques d'échantillons fixés (au sens biologique du terme, c'est-à-dire morts) afin d'étudier la distribution de tel ou tel marqueur ou protéine dans une cellule ou un tissu. Dans ce dernier type d'échantillon, nous avons vu l'avantage du microscope à deux photons pour l'imagerie en profondeur. La microscopie à deux photons permet également de faire des images pendant de longues durées de certains échantillons sensibles à l'excitation comme

⁵Les utilisateurs de microscope confocal sont souvent gênés par ce photoblanchiment excessif.

les amibes. Par exemple, une équipe a observé la division cellulaire dans un embryon de hamster en microscopie confocale et à deux photons en illumination continue. Dans le premier, la division s'est arrêtée tandis qu'elle a continué de façon tout-à-fait normale avec le microscope à deux photons, donnant au terme du développement un animal sain [Willis, 1999].

Une autre application très fréquente en imagerie est l'étude de l'activité calcique dans les cellules. Ainsi, Piston et coll. ont démontré l'utilisation de la microscopie à deux photons pour étudier la dynamique et la distribution de l'activité des ions Ca^{2+} en trois dimensions [Piston et al., 1994].

Pour les mesures de concentration et des variations de celle-ci, on combine généralement la microscopie à deux photons avec une autre technique comme la FRAP ou la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Cette dernière permet la détection de molécule unique et toutes les applications qui en découlent [Mertz et al., 1995]. Plus généralement, elle est utilisée pour mesurer le coefficient de diffusion des molécules en solution ou la viscosité du milieu intracellulaire pour une concentration de fluorophores faible [Berland et al., 1995]. Nous allons aborder ci-dessous le cas de la FRAP.

I.3.2 La technique de FRAP

I.3.2.1 Le photoblanchiment

Avant de décrire la technique de FRAP proprement dite, nous allons rappeler quelques propriétés des molécules fluorescentes et, en particulier, le photoblanchiment, ensemble des processus par lesquels une molécule perd sa faculté d'émettre de la fluorescence.

Lors du processus de fluorescence, la molécule absorbe un ou deux photons, passant d'un état électronique fondamental (énergie la plus basse) à un état électronique excité (d'une énergie plus haute que celle de l'état initial d'un quantum $h\nu$). Elle peut alors se désexciter spontanément en émettant un autre photon d'une énergie un peu plus faible. Cependant, elle peut suivre d'autres voies de désexcitation, radiatives ou non, dont certaines peuvent conduire vers des états où la molécule quitte le cycle excitation-émission de fluorescence. C'est ce processus qui est appelé photoblanchiment (en anglais *photobleaching*). La variété des événements possibles au sein de la structure électronique d'une molécule implique que l'on ne connaisse pas de façon générale les processus conduisant au photoblanchiment. Nous en écrivons juste une définition expérimentale, opérationnelle, à cause de cette méconnaissance des mécanismes exacts.

D'un point de vue pratique, on définit une grandeur mesurable par l'expérimentateur, le taux de photoblanchiment k_b , regroupant un ensemble de réactions du premier ordre (unimoléculaire). On a la relation suivante pour une concentration $C(t)$ de fluorophores dans l'échantillon :

$$\frac{dC}{dt}(t) = -k_b C(t),$$

ce qui conduit à une décroissance exponentielle de la concentration en l'absence d'autres réactions et de tout mouvement. On écrit donc :

$$C(t) = C(0) \exp(-k_b t),$$

où $C(0)$ est la concentration initiale. Expérimentalement, on détermine k_b en mesurant la fluorescence émise en fonction du temps et en utilisant l'équation $F(t) = F(0) \exp(-k_b t)$. Nous verrons plus loin quelle est la pertinence de ce modèle et quelles corrections on peut lui apporter.

Dans la suite, nous ferons l'hypothèse que k_b est proportionnel à l'intensité d'excitation pour un processus à un photon ou l'intensité à la puissance n pour un processus n -photonique. Cependant, dans le cas d'une illumination non uniforme spatialement (par exemple gaussienne), comme c'est le cas ici, k_b dépend des coordonnées spatiales. Nous aborderons ce point plus en détail dans les parties II et III, en nous plaçant dans le contexte expérimental.

I.3.2.2 Principe de la méthode

La technique de FRAP est utilisée depuis 1976 pour la mesure de la mobilité de molécules fluorescentes à l'échelle microscopique [Axelrod et al., 1976]. Cette technique consiste à illuminer fortement une région de l'échantillon de façon à photoblanchir les molécules fluorescentes situées dans cette région, puis à observer avec une puissance d'excitation beaucoup plus faible la même région, pour suivre l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Si les marqueurs fluorescents sont mobiles (diffusion ou convection), ceux qui ont été photoblanchis vont être remplacés par des marqueurs intacts, ce qui conduit à une augmentation de la fluorescence mesurée dans la région observée. La cinétique et la forme de la courbe de remontée de fluorescence permettent alors de déterminer, avec un modèle théorique adéquat, le coefficient de diffusion ou, dans le cas d'un transport convectif, la vitesse des marqueurs dans l'échantillon. Le principe est schématisé sur la figure I.3.12.

On définit plusieurs grandeurs utiles pour décrire les courbes de remontée de fluorescence. La profondeur de photoblanchiment (*bleach depth*) est le rapport entre l'intensité de fluorescence juste après la phase de photoblanchiment et l'intensité juste avant. La fraction mobile est définie par la formule :

$$\text{fraction mobile} = \frac{F(\infty) - F(0)}{F(t < 0) - F(0)},$$

où $F(\infty)$ est la valeur de l'asymptote de la courbe en $t = +\infty$, $F(0)$ la valeur juste après le photoblanchiment et $F(t < 0)$ la valeur juste avant. Une autre grandeur fondamentale est le temps caractéristique de la remontée, temps nécessaire pour que la moitié de la fluorescence soit revenue, c'est-à-dire le temps $t_{1/2}$ tel que

$$\frac{F(t_{1/2}) - F(0)}{F(\infty) - F(0)} = \frac{1}{2}.$$

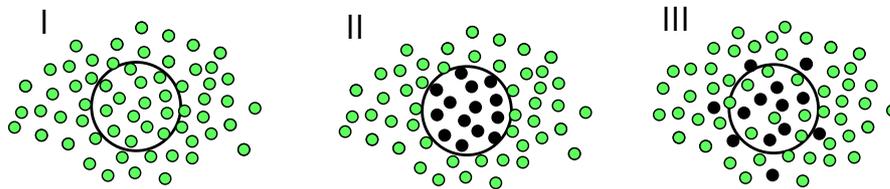
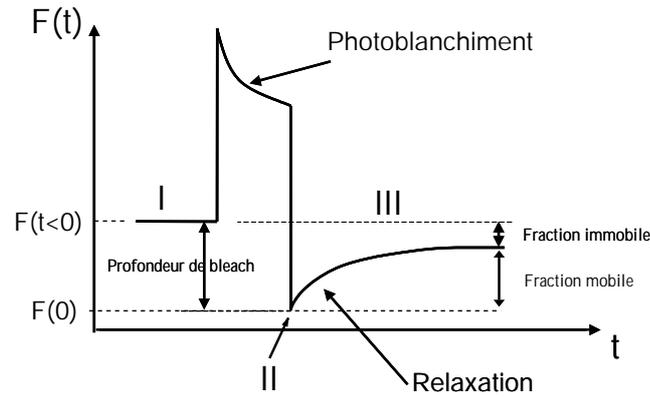


FIG. I.3.12: **Schéma de principe de la FRAP.** Dans la phase I, avant le photoblanchiment, la puissance d'excitation est faible et les marqueurs restent intacts. Dans la phase II, la puissance d'excitation est forte et conduit au photoblanchiment des marqueurs. Enfin, dans la phase III, la puissance revient à une valeur faible et la fluorescence mesurée remonte au fil du remplissage de la région photoblanchie par des marqueurs intacts.)

Le rapport entre ce temps et le temps caractéristique du mouvement (diffusion ou convection) dépend de la géométrie du système et du faisceau, de la profondeur de photoblanchiment et du type de transport (voir plus loin) [Axelrod et al., 1976].

I.3.2.3 Hypothèses et exploitation théorique

Nous allons exposer ici le modèle d'Axelrod et coll. pour l'analyse des expériences de FRAP à deux dimensions en excitation à un photon. Cette théorie concerne les cas de faisceaux gaussien et homogène circulaire, pour un mouvement diffusif, convectif et pour la combinaison des deux. Cela nous donnera une base théorique que nous pourrions adapter à notre cas, et nous montrera les courbes caractéristiques que l'on peut obtenir par cette technique.

Le point de départ de la modélisation est de définir la configuration initiale du système juste après la phase de photoblanchiment. Nous nous plaçons dans le cas d'un système plan avec une distribution uniforme de molécules fluorescentes. Pour déterminer la configuration initiale, on considère que le photoblanchiment suit une loi du premier ordre comme nous l'avons vu au début de ce chapitre. Ceci nous donne l'équation suivante pour la concentration $C(r, t)$:

$$\frac{dC}{dt}(r, t) = -\alpha I_{bl}(r) C(r, t),$$

où $I_{bl}(r)$ est l'intensité d'excitation de photoblanchiment (centrée en $r = 0$). Si la durée T de cette phase est faible devant le temps caractéristique du mouvement des fluorophores, ceux-ci peuvent être considérés comme immobiles, et la concentration à la fin de la phase de photoblanchiment de fluorescence ($t = 0$) peut s'écrire :

$$C(r, 0) = C_0 \exp[-\alpha I(r) T],$$

avec C_0 la concentration initiale avant le photoblanchiment. Cette équation donne du même coup la concentration initiale de la phase de remontée. On définit la «dose» de photoblanchiment par :

$$K = \alpha I(0) T.$$

L'évolution du système pendant la phase de remontée de fluorescence, en l'absence de photoblanchiment à P_{obs} , et en supposant que les molécules diffusent et ont un mouvement de convection selon l'axe x avec la vitesse V_0 , est décrite par l'équation aux dérivées partielles suivante :

$$\partial_t C(r, t) = D \nabla^2 C(r, t) - V_0 \partial_x C(r, t).$$

On peut choisir comme condition aux limites $C(\infty, t) = C_0$. La fluorescence observée s'écrit :

$$F_K(t) = (q/\Lambda) \int I(r) C(r, t) d^2r$$

où q est le produit de toutes les efficacités d'absorption, d'émission et de détection, et Λ est le facteur d'atténuation de l'intensité du laser ($\Lambda = P_{bleach}/P_{obs}$).

Cas diffusif

Pour un faisceau gaussien (cas le plus fréquemment rencontré en pratique), en écrivant l'intensité $I(r) = (2P_{bleach}/\pi w^2) \exp(-2r^2/w^2)$ avec w la demi-largeur à $1/e^2$, on obtient l'expression suivante pour le cas purement diffusif ($V_0 = 0$) :

$$F_K(t) = \frac{qP_{bleach} C_0}{\Lambda} \nu K^{-\nu} \Gamma(\nu) P\left(\frac{2K}{2\nu}\right),$$

où $\nu = 1/(1 + 2t/\tau_D)$, $\tau_D = w^2/4D$, $\Gamma(\nu)$ est la fonction Gamma et $P(2K/2\nu)$, la distribution de probabilité du χ^2 . La figure I.3.13 (a) montre les courbes obtenues en faisant varier le paramètre K dans la formule précédente.

La figure I.3.13 (b) représente ces mêmes courbes normalisées de la façon suivante :

$$f_K(t) = [F_K(t) - F_K(0)]/[F_K(\infty) - F_K(0)].$$

On voit sur cette figure que la relation entre $t_{1/2}$ et τ_D dépend de la valeur de K .

Cette dépendance en K est donc importante et il faut bien en tenir compte dans l'analyse des données. On peut mieux comprendre cette influence en visualisant la configuration initiale du système en fonction de ce paramètre, comme on le voit sur la figure I.3.14.

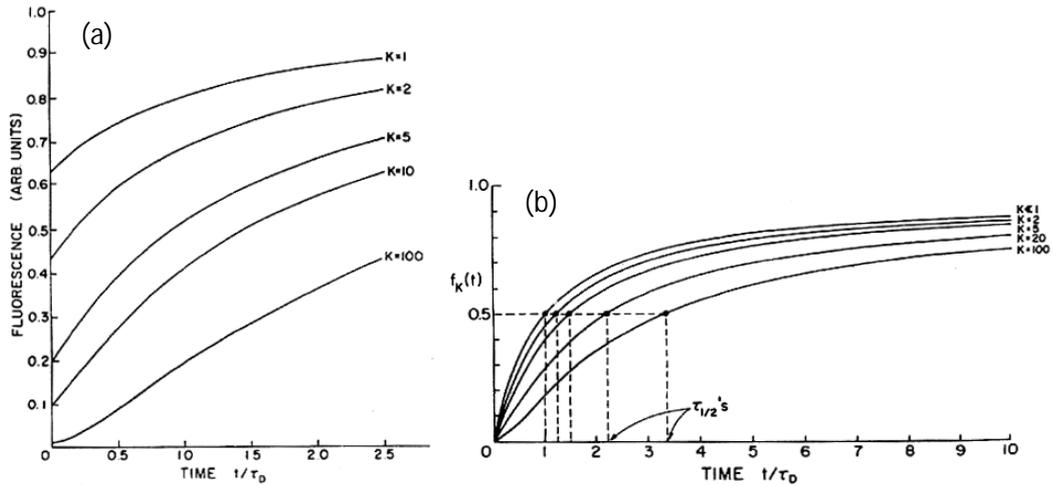


FIG. I.3.13: Courbes théoriques de remontée de fluorescence pour un ensemble de molécules diffusant librement, avec un faisceau gaussien. (a) : courbes obtenues directement par le calcul ; (b) : courbes normalisées entre 0 et 1. (D'après [Axelrod et al., 1976]).

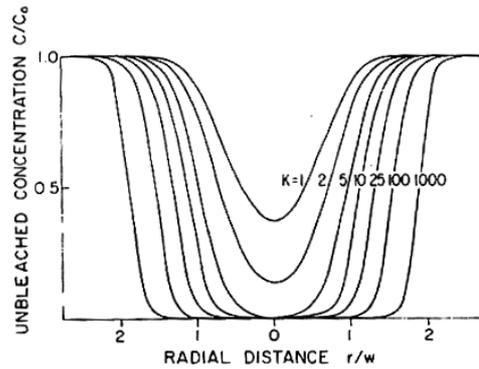


FIG. I.3.14: Concentration initiale pour différentes valeurs de K , avec un faisceau gaussien. (D'après [Axelrod et al., 1976]).

Cas convectif

Dans le cas purement convectif ($D = 0$), la formule obtenue pour la fluorescence est :

$$F_K(t) = \frac{qP_{bleach} C_0}{A} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-K)^n}{(n+1)!} \exp \left[-\frac{2n}{n+1} \left(\frac{t}{\tau_f} \right)^2 \right].$$

Cette fonction est représentée sur la figure I.3.15 pour différentes valeurs de K .

Cas diffusif et convectif

Si les deux types de mouvement sont présents ($D, V_0 \neq 0$), on a la relation suivante :

$$F_K(t) = \frac{qP_{bleach} C_0}{A} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-K)^n \exp \left[-\frac{2n}{1+n(1+\frac{2t}{\tau_D})} \left(\frac{t}{\tau_f} \right)^2 \right]}{n! [1 + n(1 + \frac{2t}{\tau_D})]}.$$

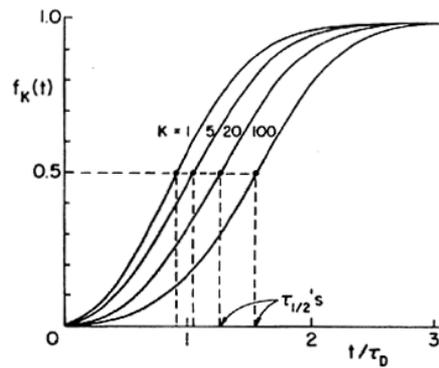


FIG. I.3.15: Courbes théoriques de remontée de fluorescence pour un mouvement purement convectif, avec un faisceau gaussien. (D'après [Axelrod et al., 1976]).

La figure I.3.16 montre la représentation graphique de cette fonction pour $K = 5$ et le rapport $\tau_f/\tau_D = 10, 1$ et $0,1$.

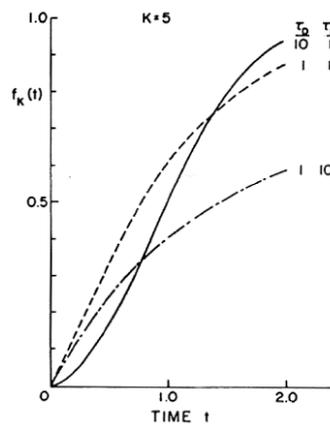


FIG. I.3.16: Courbes théoriques de remontée de fluorescence pour un mouvement diffusif et convectif, avec un faisceau gaussien. (D'après [Axelrod et al., 1976]).

Distinction diffusion/convection

On voit bien, d'après ce qui précède, que l'on peut théoriquement distinguer une remontée de fluorescence due à une population de molécules qui diffusent d'une remontée de fluorescence due à une population subissant une convection. La courbe typique du premier cas ressemble approximativement à une exponentielle (de la forme $1 - \exp(-t/\tau)$), tandis que dans le second cas on obtient une courbe de type sigmoïde. Le cas «mixte» est plus délicat à analyser et il faut ajuster la courbe théorique aux données pour se prononcer. On peut remarquer que la diffusion est efficace pour remplir le creux en concentration aux temps courts, et de moins en moins efficace au cours de la phase de remontée, tandis que la convection a une efficacité maximale à la moitié de la remontée.

En pratique, la distinction entre les deux types de mouvements n'est pas toujours possible. Par exemple, si le système expérimental possède une «fréquence de coupure» telle que le point d'inflexion sur les courbes de la figure I.3.15 n'apparaît pas dans les données, on ne pourra pas facilement distinguer les deux cas. L'analyse doit alors se compléter d'une réflexion sur le système étudié avec les informations provenant d'autres expériences pour estimer la nature du mouvement observé.

Une fois le type de mouvement connu, il s'agit d'extraire des données le paramètre fondamental de la dynamique du système, c'est-à-dire le coefficient de diffusion D et/ou la vitesse du flux V_0 . Toujours selon la théorie d'Axelrod et coll., il faut d'abord déterminer le $t_{1/2}$, puis utiliser les formules suivantes :

$$D = (w^2/4t_{1/2}) \gamma_D$$

et

$$V_0 = (w/t_{1/2}) \gamma_f,$$

avec $\gamma_D = t_{1/2}/\tau_D$ et $\gamma_f = t_{1/2}/\tau_f$. Pour un faisceau gaussien, ces coefficients dépendent de K selon une courbe représentée sur la figure I.3.17.

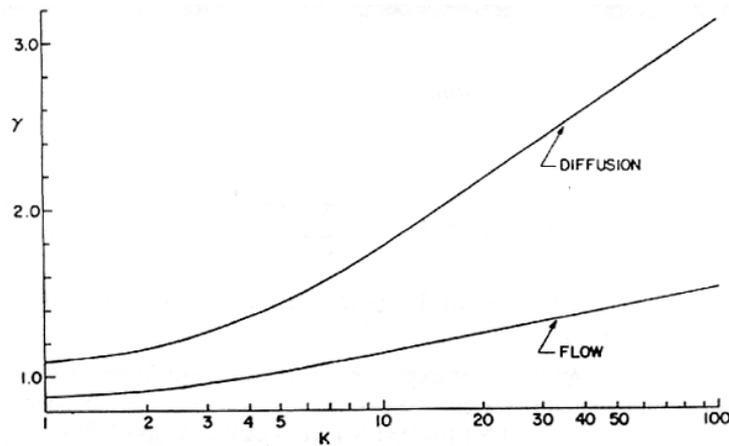


FIG. I.3.17: Variation du coefficient γ en fonction de K pour un faisceau gaussien. (D'après [Axelrod et al., 1976]).

I.3.2.4 Limitations de la technique

Nous allons donner ici une liste non exhaustive des principales difficultés inhérentes à la technique de FRAP, si l'on veut en extraire des données quantitatives :

- la molécule fluorescente doit photoblanchir approximativement selon une loi du premier ordre. Dans le cas contraire, l'interprétation des résultats est plus délicate.
- il ne doit pas y avoir de photoblanchiment réversible dans la plage temporelle utilisée.
- il faut éviter le photoblanchiment des molécules à P_{obs} pour éviter de modifier la forme de la courbe de remontée de fluorescence risquant de masquer des phénomènes peu amples et lents et de compliquer l'interprétation des données.

- pour les mêmes raisons, il faut contrôler le profil radial du faisceau laser pour qu'il soit, au moins approximativement, soit uniforme, soit gaussien.
- le temps de photoblanchiment doit être court par rapport au temps caractéristique du mouvement des fluorophores, pour éviter le phénomène de «déplétion» causé par l'échange entre molécules intactes et photoblanchies peut se faire et élargir ainsi la région photoblanchie au delà de la zone illuminée.
- la région photoblanchie doit être petite par rapport à la taille de l'échantillon si l'on veut éviter les «effets de bords» (notamment une diminution de la quantité totale de molécules fluorescentes) qui risquent de fausser les mesures et en compliquer l'interprétation.

Nous reviendrons sur ces difficultés et leur prise en compte plus loin.

Le photoblanchiment réversible

Nous souhaitons ici insister sur cette source d'erreur fréquemment passée sous silence. Il convient de vérifier si le fluorophore utilisé dans les conditions particulières de l'expérience présente du photoblanchiment réversible ou non, et si oui dans quelle gamme de temps. Il faut donc voir s'il n'y a pas deux composantes dans les courbes de remontée de fluorescence. On peut tester s'il y a bien du photoblanchiment réversible en faisant les expériences suivantes :

- faire varier la taille de la zone photoblanchie, en changeant d'objectif de microscope, par exemple. En effet, si la remontée de fluorescence observée est due à un mouvement des molécules, on doit retrouver une loi de variation de la courbe correspondante qui dépend de la taille de la région photoblanchie. S'il n'y a pas de variation, ou si une partie de la courbe reste identique quelque soit la taille, cette dernière correspond probablement à du photoblanchiment réversible ;
- changer la viscosité du milieu contenant les fluorophores, par exemple en ajoutant du glycérol dans une solution aqueuse. Le temps de diffusion étant fonction de la viscosité, les courbes devraient être renormalisables en temps s'il s'agit bien d'une remontée de fluorescence due à la mobilité des molécules fluorescentes ;
- faire varier le temps de photoblanchiment. Cela agit sur l'amplitude relative des contributions dues au photoblanchiment réversible et à la mobilité des molécules.

Ces méthodes ont été appliquées avec succès par Swaminathan et al. pour la protéine fluorescente GFP-S65T en solution aqueuse, montrant une fraction réversible avec un temps caractéristique de l'ordre de la milliseconde, dont l'amplitude varie suivant la durée de la phase de photoblanchiment [Swaminathan et al., 1997].

Il faut noter ici que ces méthodes ne sont pas toutes facilement applicables pour l'étude d'un système biologique. La première méthode sera difficilement utilisable dans une cellule vivante où le marqueur fluorescent est réparti de façon très inhomogène, entraînant une forte fluctuation de la quantité de fluorophores excités lorsque l'on fait varier la taille de la zone photoblanchie. La seconde est, elle, complètement impossible à mettre en œuvre. Par conséquent,

on pourra utiliser une méthode plus adaptée qui consiste à faire des mesures sur des cellules «fixées», c'est-à-dire des cellules traitées avec un agent réticulant qui va figer toutes les protéines et les immobiliser. Ainsi, on a un système sans sources possibles de mouvement et les courbes de remontée de fluorescence doivent être plates en l'absence de photoblanchiment réversible⁶.

I.3.2.5 Applications biologiques

Les applications de cette technique à l'étude de systèmes biologiques sont nombreuses et variées. Les principales techniques utilisées sont la FRAP en un «point» de la taille du foyer de l'objectif ou la FRAP dans une région rectangulaire de l'échantillon, région dont la taille peut atteindre celle de la cellule entière.

L'intérêt pour le biologiste est de pouvoir mesurer la mobilité des protéines ou des lipides qu'il étudie, dans des cellules vivantes, sans trop perturber le système.

Une application intéressante est l'étude du mouvement de protéines dans le cytoplasme, qui permet également de mieux caractériser les propriétés physiques de ce milieu comme sa viscosité. Ainsi, Jacobson et coll. ont mesuré la mobilité de protéines de taille variable dans des fibroblastes et ont montré que la diffusion était réduite par rapport à ces protéines en solution aqueuse, mais que dans le cytoplasme, il n'y avait pas de dépendance du mouvement en fonction du poids moléculaire des protéines [Jacobson and Wojcieszyn, 1984].

On peut également étudier les échanges entre les compartiments subcellulaires en photoblanchissant complètement un compartiment et en observant son éventuel remplissage par des fluorophores intacts dû à une communication avec un autre compartiment dont la fluorescence totale diminue parallèlement. En plus d'une information qualitative montrant s'il y a ou non échange entre les compartiments, on peut estimer le coefficient de diffusion de la protéine étudiée, même s'il s'agit plutôt d'un coefficient effectif à cause de la géométrie complexe des compartiments cellulaires. Par cette technique, Nehls et coll. ont étudié la dynamique et la rétention de protéines dans le réticulum endoplasmique pour des protéines repliées ou non [Nehls et al., 2000].

I.3.3 La FRAP en excitation à deux photons

I.3.3.1 Principe

Lors d'une expérience de FRAP en excitation en un photon, l'intégralité du cône de lumière émergeant de l'objectif excite les molécules fluorescentes et entraîne leur photoblanchiment.

⁶Cette méthode est utilisée par A.S. Verkman pour ses expériences sur cellules vivantes (communication personnelle).

Ainsi, les mouvements des molécules selon l'axe optique ne sont pas détectés et l'on mesure un coefficient de diffusion effectif à deux dimensions, même en utilisant un microscope confocal [Williams et al., 1994]. La mesure d'un coefficient de diffusion tridimensionnel est donc impossible par cette technique et conduit à des valeurs fortement erronées avec un écart d'un facteur 10 à 50 par rapport à la valeur réelle suivant l'objectif utilisé [Brown et al., 1999]. La FRAP en excitation est donc limitée à la mesure de la diffusion dans des échantillons très fins comme, par exemple, les membranes lipidiques.

L'utilisation conjointe de la FRAP et de la microscopie à deux photons permet de lever cette limitation et de mesurer la diffusion en trois dimensions, grâce à la localisation intrinsèque de l'excitation des molécules fluorescentes [Piston et al., 1992, Brown et al., 1999]. Il devient possible de «sonder» les échantillons localement pour mesurer la diffusion de protéines, par exemple.

Brown et coll. ont ainsi validé la FRAP à deux photons en vérifiant que le coefficient de diffusion de la Green Fluorescent Protein (GFP) était conforme aux valeurs publiées et que la mesure pouvait être faite également dans le cytoplasme des cellules vivantes [Brown et al., 1999]. Néanmoins, cette technique n'a pas encore été appliquée à l'étude du mouvement de protéines fonctionnelles dans les cellules vivantes.

I.3.3.2 Interprétation des expériences

Etant donné que nous souhaitons faire des mesures tridimensionnelles, la théorie d'Axelrod et al. exposée précédemment n'est plus valable. Elle est en effet établie pour un système bidimensionnel et prend tout son intérêt pour l'étude de membranes planes, par exemple. Il faut donc établir un nouveau modèle qui tienne compte du mouvement des molécules dans les trois dimensions.

Actuellement, un seul modèle a été proposé. Il traite le cas d'une population de molécules diffusives dans un milieu infini (typiquement un fluorophore en solution), avec une durée de la phase de photoblanchiment courte devant le temps caractéristique de diffusion. Malheureusement, ce modèle n'est pas applicable à une région confinée comme la bordure en brosse des entérocytes, très loin d'un milieu infini, sans obstacles à la diffusion [Brown et al., 1999]. Une discussion plus approfondie de ce modèle et des contraintes de notre système sera faite dans la partie III.

I.3.3.3 Photoblanchiment à deux photons

Dans le modèle précédent, le photoblanchiment à deux photons a été considéré comme un processus du premier ordre dépendant de l'intensité d'excitation au carré comme la fluorescence. Cependant, le photoblanchiment à deux photons est très peu connu, et les mécanismes peuvent être assez différents de ceux à un photon. Une seule étude a été menée pour mieux

comprendre ce processus, montrant que le temps caractéristique de photoblanchiment varie plutôt comme l'intensité d'excitation à une puissance ≥ 3 (jusqu'à 5 pour l'aminocoumarine) et non comme le carré. On aurait donc plutôt affaire à des processus de photoblanchiment d'ordre supérieur [Patterson and Piston, 2000]. Dans le cadre de la EGFP, le fluorophore que nous avons utilisé, nous avons estimé nous même le photoblanchiment comme nous le verrons dans la partie III.

Deuxième partie

Systeme experimental

Chapitre II.1

Modèle biologique

Afin de suivre le mouvement des protéines qui nous intéressent, BBMI et l'actine, il a fallu utiliser un marqueur fluorescent lié aux protéines et utilisable dans des cellules vivantes. Nous verrons donc, dans ce chapitre, quel fluorophore nous avons sélectionné.

D'autre part, nous avons dû choisir un système cellulaire modèle biologique des entérocytes, permettant de visualiser spécifiquement les protéines étudiées dans des cellules vivantes. Nous avons caractérisé la localisation des protéines dans ces cellules, ainsi que la taille de la bordure en brosse. Nous décrirons les cellules utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques.

II.1.1 Choix du fluorophore

Pour toutes les expériences menées dans cette étude, nous avons utilisé une GFP (Green Fluorescent Protein) comme marqueur fluorescent pour suivre les protéines d'intérêt. En effet, la GFP permet de visualiser une protéine dans des cellules vivantes, de façon «intrinsèque». La GFP appartient à une vaste famille de protéines possédant différentes propriétés photophysiques variables, et parmi lesquelles nous avons cherché la plus adaptée à notre étude.

II.1.1.1 Les différents mutants de la Green Fluorescent Protein (GFP)

Depuis la découverte de la GFP par Shimomura et coll. en 1962 chez la méduse *Aequorea victoria* [Shimomura et al., 1962] et surtout depuis le décryptage de sa séquence d'acides aminés et de sa structure tridimensionnelle, les biologistes se sont beaucoup servis de cet outil comme marqueur fluorescent dans les cellules vivantes. En effet, on peut faire pénétrer dans les cellules l'ADN codant pour la protéine d'intérêt fusionné à l'ADN codant pour la GFP choisie. Les cellules ayant incorporé correctement l'ADN étranger synthétisent ensuite cette protéine liée à la GFP. Cette possibilité de disposer de cellules vivantes marquées multipliables à volonté a

ouvert un vaste champ d'étude, notamment sur les phénomènes dynamiques cellulaires.

De plus, de nombreuses équipes ont produit des mutants de la GFP sauvage (*wild-type*) afin d'en modifier les propriétés photophysiques comme le spectre d'excitation et d'émission, ou encore l'efficacité quantique de fluorescence. Les possibilités de marquage se sont donc accrues, autorisant même des marquages multiples au sein de la même cellule.

Ces mutants sont répartis en 7 classes principales suivant la nature chimique du chromophore. En effet, ce sont les mutations des acides aminés constituant le chromophore qui modifient les propriétés photophysiques. La GFP la plus couramment utilisée pour marquer des protéines est la EGFP (Enhanced GFP) dont nous allons voir les propriétés ci-dessous.

II.1.1.2 Comparaison entre EGFP et GFPuv

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à deux mutants de la GFP, la EGFP (mutations F64L, S65T) et la GFPuv (F99S, M153T, V163A). La EGFP a un pic d'excitation à un photon situé à 488 nm et un pic d'émission vers 509 nm. La GFPuv, elle, a un pic d'excitation situé à 397 nm (d'où son nom) et un pic d'émission vers 506 nm.

Pour caractériser ces deux protéines, nous avons d'abord mesuré leur spectre d'émission en excitation à deux photons. Le spectre de la EGFP a été fait sur des cellules de culture HeLa transfectées transitoirement avec l'ADN codant pour la protéine. Les cellules sélectionnées possédaient un marquage cytoplasmique diffus. Pour la GFPuv, les mesures ont été faites dans divers échantillons : en solution, exprimée dans des bactéries, dans un lysat de bactéries ou encore dans les cellules HeLa transfectées comme pour la EGFP. La figure II.1.1 montre les spectres d'émission en excitation à un et deux photons pour chaque protéine.

On constate, d'une part, qu'il n'y a pas de différence notable à l'émission entre les deux modes d'excitation, ni entre les deux protéines. Les spectres présentent tous un seul pic à environ 509 nm. Nous pourrions donc utiliser les mêmes filtres d'émission pour observer les deux protéines et comparer leur fluorescence. D'autre part, on peut noter que les spectres d'émission à deux photons de la GFPuv faits dans des conditions différentes sont presque superposables ormis la «queue» située dans le rouge des spectres. Ceci indique une certaine robustesse des propriétés spectrales de cette protéines envers les variations de son environnement.

Le spectre d'émission des deux protéines étant assez identiques, nous avons voulu comparer l'intensité du marquage dans les deux modes d'excitation en utilisant le même filtre d'émission. Nous avons donc observé les cellules HeLa transfectées avec le microscope à deux photons et en épifluorescence classique. Peu de cellules transfectées avec l'ADN de la GFPuv étaient fluorescentes contrairement à celles transfectées avec l'ADN de la EGFP, et même celles qui l'étaient avaient un signal plus faible que celles exprimant la EGFP.

Pour vérifier si cette différence venait du fait que la GFPuv s'exprimait mais n'était pas fluorescente (à cause d'un problème de repliement de la protéine, par exemple), nous avons analysé

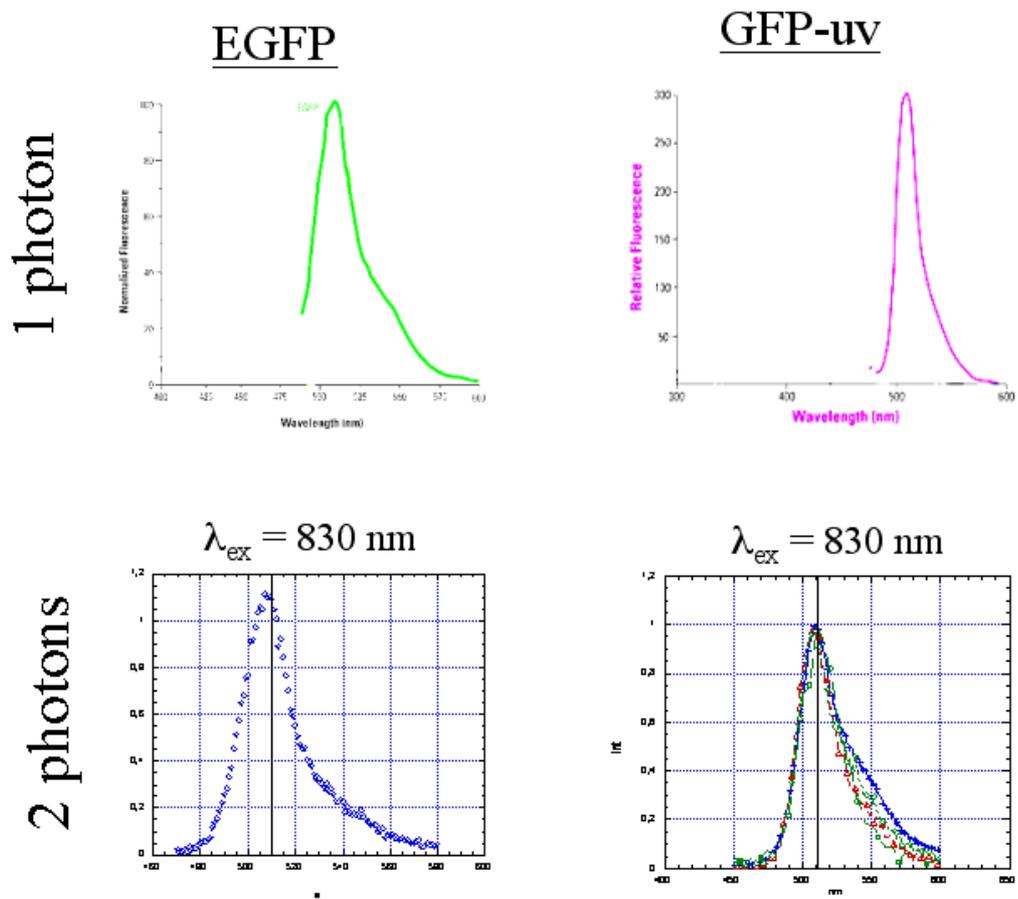


FIG. II.1.1: Spectres d'émission en excitation à un et deux photons de la EGFP et de la GFPuv. La longueur d'onde d'excitation à deux photons était de 830 nm. La ligne verticale sur les spectres à deux photons indique la valeur de 510 nm pour la longueur d'onde.

la quantité de protéines produite dans les cellules après séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et réplique immunologique, à partir des cellules HeLa transfectées (voir figure II.1.2).

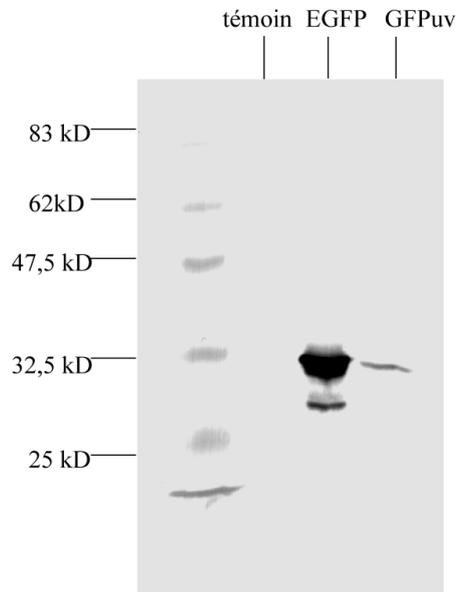


FIG. II.1.2: Réplique immunologique de cellules HeLa transfectées avec l'ADN codant pour la EGFP ou la GFPuv. La première colonne montre des bandes correspondant aux marqueurs de poids moléculaire. La seconde montre le résultat obtenu avec des cellules HeLa non transfectées et sert de témoin. Sur les deux autres colonnes, on observe une bande vers 30 kD qui correspond au poids moléculaire de la GFP.

Il apparaît que la quantité de protéines EGFP est beaucoup plus importante que la quantité de GFPuv, ce qui indique que cette dernière est moins exprimée, à promoteur et durée de maturation égaux. Ces observations sont cohérentes avec la faible fluorescence mesurée dans les cellules GFPuv et nous ont conduit à choisir la EGFP comme marqueur des protéines étudiées.

II.1.2 Modèle cellulaire

Nous allons décrire maintenant le modèle cellulaire utilisé pour cette étude. Nous caractériserons la distribution des protéines d'intérêt dans ce modèle et la géométrie de la bordure en brosse.

II.1.2.1 Les cellules Caco-2

Dans l'introduction, nous avons vu les particularités des entérocytes. Cependant, pour notre étude, nous n'avons pas utilisé directement des cellules intestinales (culture primaire) car elles ne survivent pas assez longtemps en culture et posent des problèmes de transfection. De plus, nous aurions un échantillon avec des cellules dans toutes les orientations à cause de

la forme des villosités, ce qui influencerait beaucoup sur la géométrie de la région photoblanchie et, par conséquent, sur les résultats des expériences de FRAP. Une autre difficulté provient du marquage des protéines étudiées qui ne serait possible, dans ce cas, qu'en produisant des animaux transgéniques, technique beaucoup plus lourde que l'utilisation de cellules isolées.

Nous avons donc utilisé une lignée cellulaire, les cellules Caco-2. Ce sont des cellules provenant d'une tumeur cancéreuse, un adéno-carcinome colique humain, ce qui leur confère la faculté de se diviser indéfiniment et donc une utilisation aisée en laboratoire. Elle forment, de plus, une monocouche plane, ce qui évite les problèmes cités plus haut. Ce sont donc des cellules de type entérocyte, dont les caractéristiques morphologiques sont intermédiaires entre les cellules de l'intestin grêle et du côlon [Pinto et al., 1983].

Ces cellules forment une monocouche sur le support de culture (lamelle de verre) en gardant leur organisation en épithélium prismatique simple et servent de modèle de barrière épithéliale dans de nombreuses expériences pharmaceutiques. En effet, on les cultive souvent sur une membrane poreuse permettant l'échange entre deux compartiments pour étudier le passage de différentes molécules entre les deux pôles cellulaires par transport transépithélial.

Les cellules Caco-2 sont, de plus, déjà couramment utilisées pour les études sur la bordure en brosse. En effet, elles possèdent une bordure en brosse régulière (voir figure II.1.3), constituée des principales protéines que nous avons vues dans l'introduction : BBMI, l'actine, l'eitrine, la villine, la fimbrine. La hauteur de ces cellules est d'environ 15 à 20 μm pour 10 μm de large.

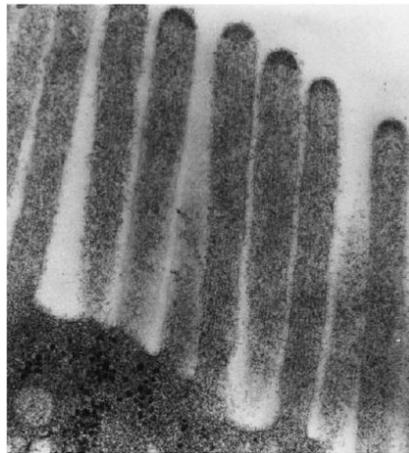


FIG. II.1.3: Micrographie en microscopie électronique des microvillosités de la bordure en brosse des cellules Caco-2 [Jackman et al., 1994].

Les cellules utilisées pour nos expériences sont des clones cellulaires stables exprimant soit BBMI-GFP, soit actine-GFP, soit un domaine non-fonctionnel de BBMI, BBMI Δ 730-GFP, qui correspond au domaine de «queue» de la myosine (acides aminés 730 - 1040). La EGFP a été placée à l'extrémité amino-terminale de BBMI comme cela a déjà été fait pour la myosine II sans que les propriétés motrices de celle-ci n'aient été altérées [Moore et al., 1996].

Pour les expériences, les cellules sont mises en culture avec une forte densité (500 000 cellules.cm⁻²) de façon à être confluentes dès le lendemain de l'ensemencement. Elles sont déposées soit sur une membrane poreuse dans un système permettant la séparation entre le milieu de culture placé au pôle apical et le milieu situé au pôle basal des cellules, soit sur une lamelle de verre de 22 mm de diamètre, sur laquelle a été préalablement déposé (sur une nuit) du collagène de rat de type I (32 µg.cm⁻²). Elles sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C avec 10 % de CO₂. Les expériences décrites dans ce chapitre ont été faites sur des cellules cultivées sur les membranes poreuses. Les expériences de FRAP ont toutes été faites sur lamelles de verre collagénées.

La veille des expériences, les cellules Caco-2 BBMI-GFP et BBMIΔ730-GFP doivent être incubées toute la nuit avec du butyrate de sodium à 10 mM dans le milieu de culture pour activer l'expression de ces protéines. Les cellules actine-GFP n'ont pas besoin de ce traitement car le promoteur utilisé est constitutivement actif.

II.1.2.2 Distribution des protéines du cytosquelette dans les cellules utilisées

Lorsque l'on utilise des cellules exprimant une protéine exogène, il est nécessaire de vérifier que celle-ci ne perturbe pas l'organisation de la cellule, ni son fonctionnement, en entrant en compétition avec la protéine endogène (activité dominant négative) et qu'elle se localise comme celle-ci. Dans notre cas, étant donné la localisation de BBMI dans la bordure en brosse, nous avons vérifié si les principales protéines de cette région n'étaient pas affectées par la présence de BBMI-GFP.

Pour observer la distribution des protéines dans les cellules Caco-2 exprimant BBMI-GFP, nous les avons marquées par immunofluorescence indirecte ¹, sauf l'actine, pour laquelle nous possédons une molécule qui se fixe sur les filaments, la phalloïdine, couplée à un fluorophore. Les cellules ainsi marquées ont été mises entre lame et lamelle dans un milieu contenant 50 % de glycérol et 50 % de PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

Nous avons ensuite fait des images de ces échantillons avec un microscope confocal pour obtenir la distribution tridimensionnelle des protéines marquées. Les observations ont été faites sur des cellules à différents stades de différenciation, entre 3 et 9 jours de culture sur lamelle. Les résultats sont résumés sur la figure II.1.4.

BBMI-GFP est très abondante dans la bordure en brosse, mais présente également au niveau de la membrane basolatérale, comme la protéine endogène. L'ezrine est localisée exclusivement dans les microvillosités, tandis que la villine est présente dans les microvillosités et dans le réseau terminal, comme dans les entérocytes. Sur la période étudiée, seule la villine modifie très légèrement sa distribution. Elle est plus présente dans le réseau terminal au bout de 9 jours

¹Le marquage par immunofluorescence consiste en l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine concernée, que l'on révèle ensuite par un second anticorps dirigé contre le premier et conjugué à une molécule fluorescente.

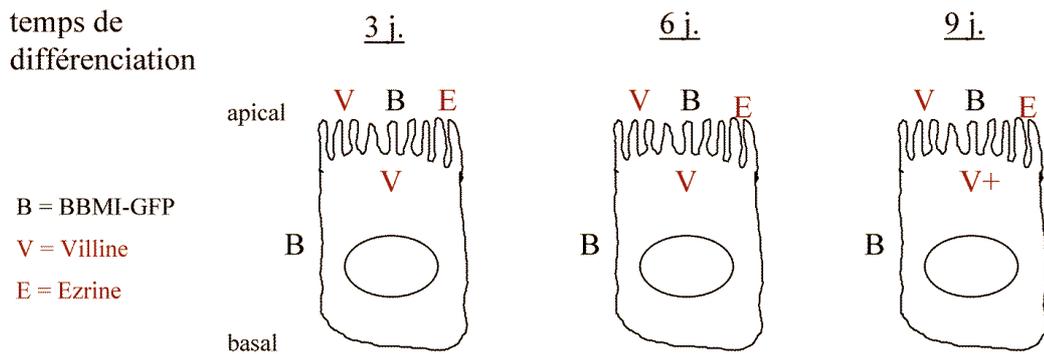


FIG. II.1.4: Localisation de quelques protéines de la bordure en brosse au cours de la différenciation.

de culture. La période entre 3 et 9 jours de culture est donc favorable à l'observation de la dynamique de la bordure en brosse car elle est dans un état «stationnaire» du point de vue de sa structure.

La localisation des protéines observées correspond bien à celle connue dans les cellules Caco-2 non modifiées [Peterson et al., 1993]. Nous pouvons donc supposer que la présence de BBMI-GFP dans la cellule n'affecte pas la structure de la bordure en brosse entre 3 et 9 jours de culture et que nous restons dans des conditions valables pour étudier sa dynamique.

De plus, nous avons vérifié si BBMI-GFP et l'actine étaient bien colocalisées dans la bordure en brosse et à la membrane latérale (comme pour BBMI endogène), et si l'actine-GFP suivait la localisation de l'actine endogène. Pour cela, nous avons marqué les filaments d'actine par de la phalloïdine couplée au fluorophore TRITC (Tétraméthylrhodamine-isothiocyanate) dans des cellules exprimant BBMI-GFP ou l'actine-GFP. Nous avons ensuite fait des images de ces cellules en microscopie confocale (voir figure II.1.5).

La première rangée d'images montre une vue en coupe (XZ) de la monocouche de cellules dont on voit les contours et la bordure en brosse. En effet, l'actine est distribuée tout au long de la membrane plasmique basolatérale et dans les microvillosités, que ce soit l'actine-GFP ou l'actine endogène. On voit sur la seconde rangée une vue de haut des cellules (XY). Les deux rangées suivantes montrent les mêmes coupes pour BBMI-GFP et l'actine endogène. Là encore, les deux protéines sont colocalisées.

Nous avons également étudié la localisation de BBMI Δ 730-GFP par la même technique. Nous voyons sur la figure II.1.5 qu'elle est colocalisée avec l'actine et qu'elle a la même distribution que BBMI-GFP. Cela pourrait indiquer que le domaine carboxy-terminal de BBMI est suffisant pour assurer sa localisation correcte dans la cellule.

II.1.2.3 Mesure de la hauteur de la bordure en brosse des cellules Caco-2

Nous avons estimé la taille de la bordure en brosse dans ces cellules pour mieux connaître la géométrie du système. Cela est utile pour le positionnement de la région où l'on veut faire

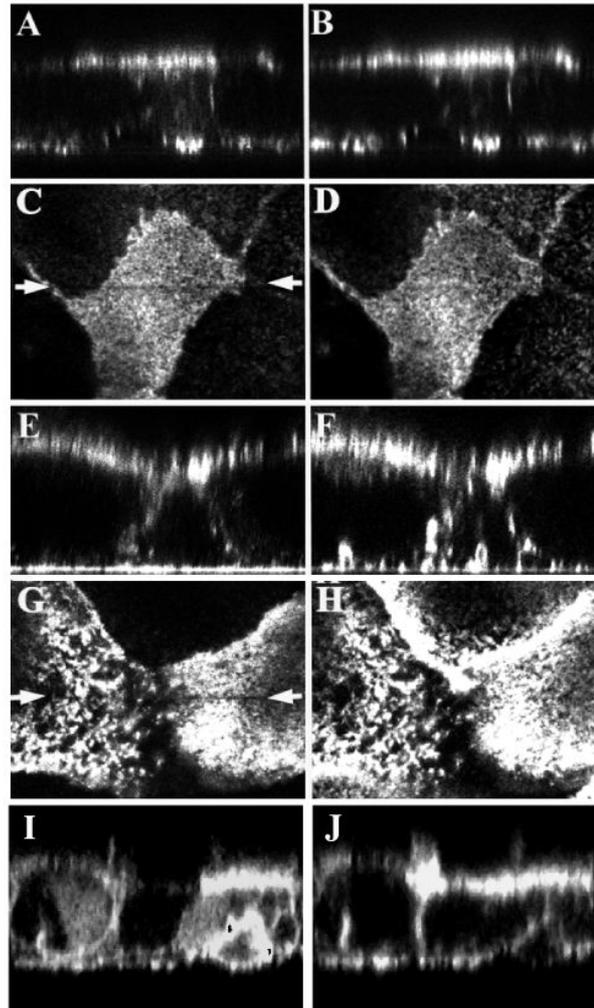


FIG. II.1.5: **Comparaison de la localisation de l'actine-GFP, de BBMI-GFP et de BBMI Δ 730-GFP par rapport à l'actine endogène.** Sections optiques XY (C, D, G, H) et XZ (A, B, E, F, I, J) en microscopie confocale. Les flèches montrent la position des coupes XZ dans les cellules (matérialisée de surcroît par une ligne plus sombre due au photoblanchiment lors de l'acquisition). A et C : actine-GFP ; B, D, F et H : F-actine ; E et G : BBMI-GFP ; I et J : BBMI Δ 730-GFP.

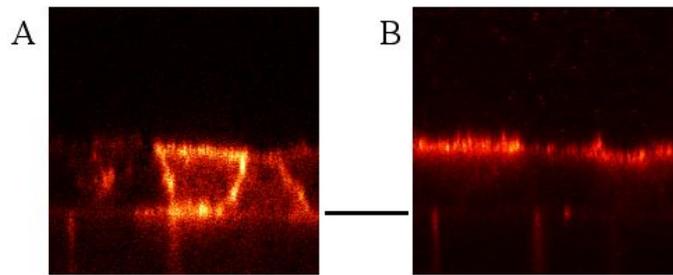


FIG. II.1.6: Comparaison entre la localisation de BBMI-GFP (A) et de l'ezrine (B), marquée par immunofluorescence, dans les cellules Caco-2. Les cellules sont orientées avec le pôle apical vers le haut. La barre noire montre la position de la membrane poreuse (ou filtre) sur laquelle sont cultivées les cellules.

de la FRAP, ainsi que pour l'interprétation des résultats et pour modéliser le système.

Nous avons fait ces mesures en microscopie confocale sur des cellules Caco-2 dont l'ezrine a été marquée par immunofluorescence. Nous avons vu en effet que l'ezrine est strictement localisée dans les microvillosités et fournit donc un bon marqueur de cette région. La figure II.1.6 montre la différence de localisation entre l'ezrine et BBMI-GFP et confirme cette observation.

La taille de la bordure en brosse est estimée à partir de séries d'images dans des plans séparés verticalement de $0,1 \mu\text{m}$ pour mieux définir le profil d'intensité mesuré². On mesure ainsi un profil de l'intensité de fluorescence moyenne en fonction de la profondeur z .

A partir de ce profil, on peut estimer la hauteur de la bordure en brosse en déterminant la largeur à mi-hauteur (*FWHM* : *Full Width at Half Maximum*). Ce critère de détermination de la largeur de la bordure en brosse a été choisi pour diminuer l'erreur due à la convolution du profil réel de distribution de la fluorescence par la PSF. Un autre intérêt de ce critère est sa moindre sensibilité à un mauvais rapport signal/bruit. Dans ce cas, si l'on mesure la largeur à $1/e$ ou $1/e^2$, le bruit de fond conduit à des erreurs plus importantes. La figure II.1.7 résume le principe de cette mesure.

Nous avons fait cette mesure sur différentes régions de la bordure en brosse et dans plusieurs cellules pour avoir une estimation de la variabilité de la hauteur d'une cellule à l'autre. De plus, nous avons répété cette procédure pour des cellules à différents stades de différenciation pour déceler une éventuelle variation de la hauteur au cours du temps de culture. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus sous la forme : moyenne \pm écart-type.

Temps de différenciation	3 j.	6 j.	9 j.
Hauteur de la BB (μm)	$2,4 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$

On voit qu'il n'y a pas de variation significative de la hauteur de la bordure en brosse au

²Cette faible valeur du pas entre les plans ne permet pas cependant une mesure plus précise qu'avec un pas plus grand, car la limitation vient de la taille de la PSF axiale. Il suffit donc de prendre un pas égal à la moitié de cette taille (théorème de Shannon) pour reconstruire le profil. Le suréchantillonnage donne seulement un aspect plus «lisse» à la courbe.

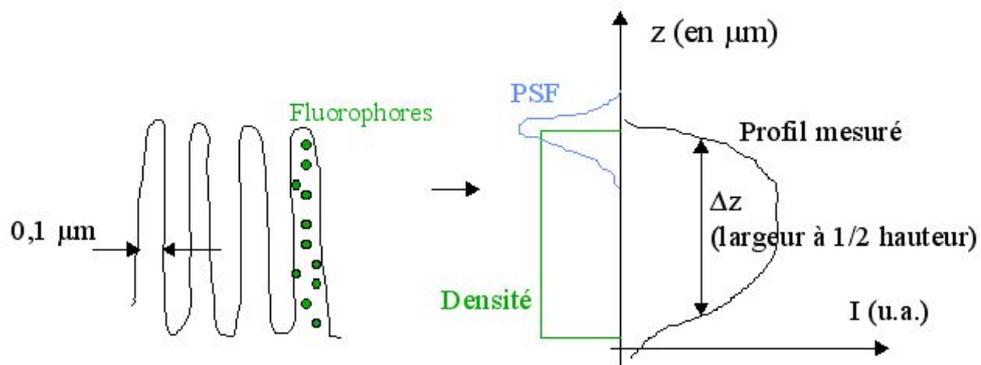


FIG. II.1.7: Principe de la mesure de la hauteur de la bordure en brosse. Le profil mesuré est le résultat de la convolution de la PSF et du profil de densité réel de fluorophores.

cours du temps de culture, entre 3 et 9 jours après l'ensemencement. Cette période est également celle pendant laquelle la localisation des protéines est stable. Nous observerons donc les cellules dans cette plage de temps.

Chapitre II.2

Dispositif expérimental

Nous allons décrire maintenant comment nous avons mis en oeuvre pratiquement les techniques de microscopie et de FRAP à deux photons exposées dans la partie I. Nous commencerons par la description du microscope à deux photons, puis du montage spécifique à la FRAP. Enfin, nous caractériserons les éléments essentiels du montage pour la FRAP afin d'évaluer la fiabilité des mesures faites avec notre instrument.

II.2.1 Le microscope à deux photons

Le dispositif utilisé pour faire de la microscopie à deux photons doit permettre d'exciter efficacement les molécules fluorescentes en excitation à deux photons et d'utiliser la fluorescence pour former une image de l'échantillon. Cela nécessite de choisir une source de lumière adéquate, un système de balayage de la lumière dans l'échantillon et un dispositif de détection de la fluorescence et d'acquisition du signal. Notre microscope à deux photons est basé sur un microscope confocal commercial (Fluoview, Olympus) modifié. Les principales modifications concernent le choix de la source lumineuse, le couplage de cette source avec le système de balayage et la suppression du pinhole, inutile en microscopie à deux photons (voir partie I). Nous allons décrire ici les parties de l'instrument essentielles pour l'utilisation en imagerie. Nous verrons d'abord la partie matérielle, puis la partie logicielle.

II.2.1.1 Matériel utilisé

Principe du montage

Le dispositif expérimental est composé principalement des éléments représentés sur la figure II.2.1 suivant leurs liens logiques.

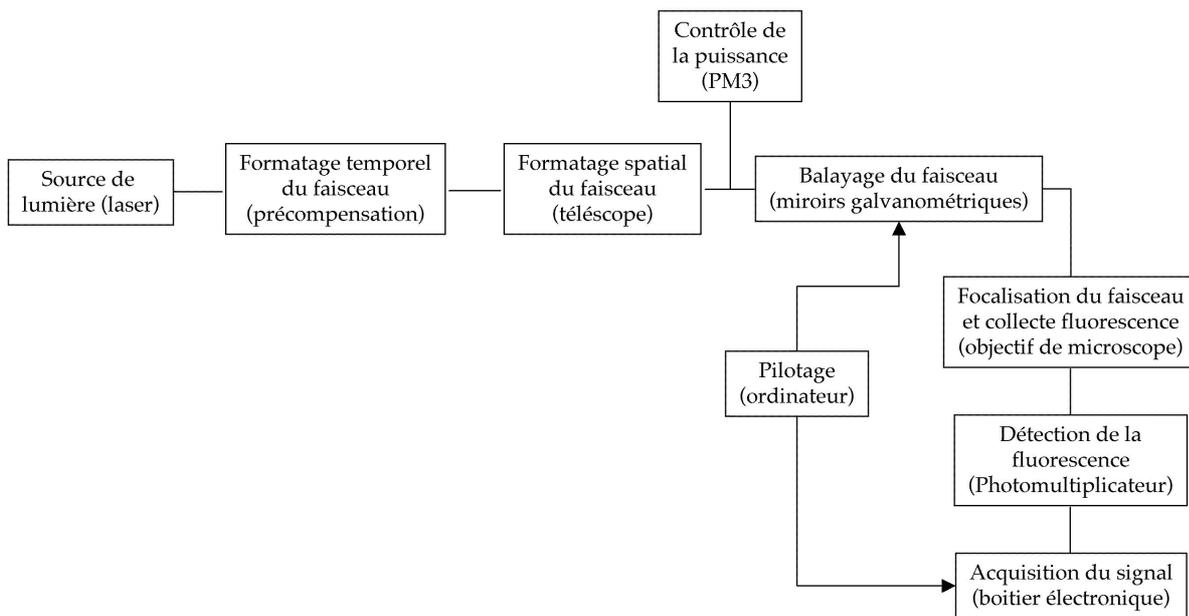


FIG. II.2.1: Schéma logique du dispositif expérimental.

Plus précisément, le montage doit permettre :

- d’exciter les molécules fluorescentes par l’utilisation d’une source de lumière adaptée (ici, un laser femtoseconde) ;
- de préparer le faisceau lumineux temporellement (pour augmenter l’efficacité d’excitation) et spatialement (pour éviter les pertes de puissance dues à un faisceau trop large qui «déborde» des éléments optiques) ;
- de balayer le faisceau dans l’échantillon pour pouvoir en faire une image (suivant le principe vu paragraphe I.3.1.2) ;
- de focaliser le faisceau pour obtenir une excitation efficace et localisée dans un faible volume ;
- de collecter la fluorescence et la détecter ;
- d’acquérir le signal fourni par le détecteur ;
- de piloter le système de balayage et l’acquisition en les synchronisant afin que l’image formée corresponde bien à la région de l’échantillon choisie.

Description du montage

Les paragraphes ci-après décrivent plus en détail chaque élément du dispositif expérimental. La figure II.2.2 montre une vue d’ensemble du dispositif.

Le laser : La source utilisée doit fournir une lumière dont la longueur d’onde est située dans le proche infrarouge avec une puissance crête importante, à cause de la faible valeur des sections efficaces à deux photons. Nous avons donc choisi un laser pulsé, femtoseconde, accord-

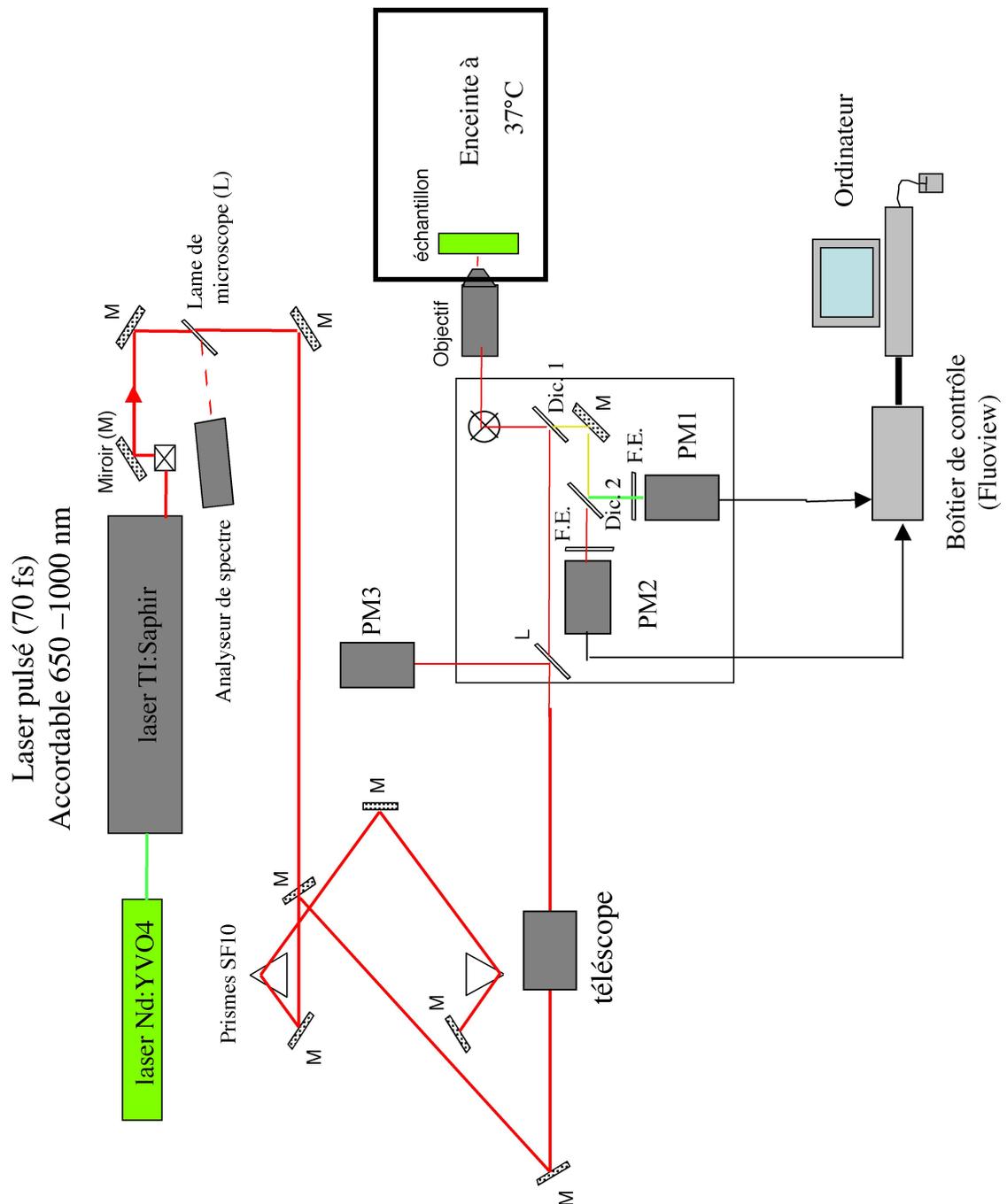


FIG. II.2.2: Schéma simplifié du dispositif expérimental. F.E. : filtre d'émission, Dic. : miroir dichroïque, PM : photomultiplicateur.

able en longueur d'onde entre 690 et 1080 nm, et qui fournit une puissance moyenne d'environ 400 mW à 900 nm, répartie en impulsions de 70 fs avec une fréquence de répétition de 82 MHz. On obtient donc une puissance crête d'environ 40 kW à la sortie du laser. Cependant, nous utilisons une puissance nettement plus faible à l'échantillon en utilisant des filtres neutres de forte densité optique et le modulateur électro-optique. En pratique, la source est constituée d'une chaîne de trois éléments. Des diodes lasers de forte puissance «pompent» un laser Nd :YVO₄¹ (Millenia, Spectra Physics) de 5 W de puissance maximale, doublé en fréquence, produisant une lumière à 532 nm (vert). Lui-même pompe un laser pulsé Ti :Saphir (Tsunami, Spectra Physics). C'est la lumière produite par ce dernier laser que nous utilisons pour nos expériences.

Un analyseur de spectre est placé à la sortie du laser pour régler la longueur d'onde, vérifier qu'il est en mode pulsé et contrôler la largeur spectrale de la lumière émise. En effet, la lumière sortant d'un laser pulsé n'est pas monochromatique comme dans le cas d'un laser continu, mais possède un spectre plus étendu à cause de la relation d'incertitude entre la durée des impulsions et la largeur du spectre. Dans notre cas, le spectre a une largeur à mi-hauteur de 10-15 nm typiquement.

Précompensation : Cet étalement chromatique de la lumière sortant du laser implique que les différentes longueurs d'onde traversent un milieu dispersif (comme le verre) à des vitesses de groupe différentes, les longueurs d'onde plus élevées ayant une vitesse plus grande. Ceci entraîne un élargissement temporel des impulsions d'autant plus important que la durée des impulsions est courte et le milieu plus dispersif. On parle de dispersion de vitesse de groupe pour désigner ce phénomène. Cet élargissement (et donc cette perte de concentration temporelle de la lumière) a comme conséquence une diminution de la fluorescence produite par excitation à deux photons car le nombre de photons absorbés suit la relation $N_{abs.} \propto \frac{\langle P \rangle^2}{\tau}$, où τ est la durée des impulsions.

Afin de compenser cette perte, importante en particulier dans l'objectif de microscope, nous avons placé un système de «précompensation» constitué de deux prismes et de trois miroirs, représenté sur la figure II.2.3. Ce système permet d'obtenir une dispersion négative qui compense la dispersion positive due aux éléments optiques.

Le miroir 1 (voir figure II.2.3) récupère la lumière ayant déjà fait un passage par les deux prismes et la réfléchit vers le reste du montage. Cela implique que le faisceau après passage dans les prismes soit à une hauteur plus faible qu'avant son entrée dans le système de pré-compensation, ce qui est réalisé en inclinant légèrement le miroir 4 vers le bas. Le miroir 3 sert seulement à augmenter le trajet optique du système tout en limitant la place occupée sur la table optique, par repliement.

¹C'est-à-dire que le milieu amplificateur de la cavité du laser est un cristal de yttrium vanadate dopé avec des ions néodyme.

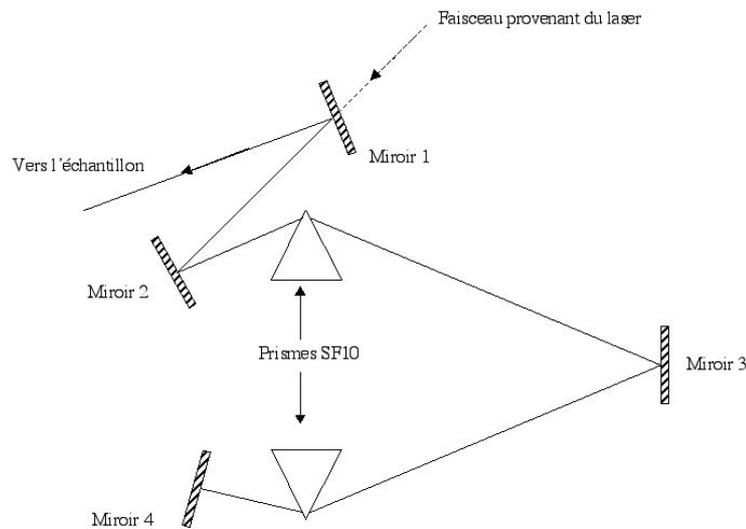


FIG. II.2.3: Le système de précompensation de la dispersion de vitesse de groupe.

Système de balayage : Le déplacement du faisceau laser dans l'échantillon est assuré par un couple de miroirs galvanométriques pilotés par l'électronique du système Fluoview (Olympus), et commandés par le logiciel d'acquisition. La figure II.2.4 représente le principe de fonctionnement des deux miroirs galvanométriques. Le miroir du bas a un mouvement oscillant

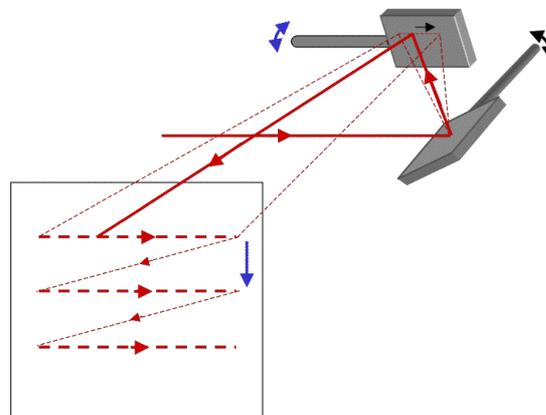


FIG. II.2.4: Principe de fonctionnement des miroirs galvanométriques.

rapide, balayant une ligne dans l'échantillon. Le second miroir a un mouvement plus lent et tel que la ligne suivante commence en dessous de la précédente. Ainsi, une image est formée par la succession de ces lignes balayées dans l'échantillon, à la fréquence choisie par l'utilisateur.

Microscope : Nous avons choisi un microscope inversé IX70 (Olympus), mieux adapté à l'étude de cellules vivantes qu'un microscope droit (où l'objectif est au-dessus de l'échantillon) et laissant l'accès au milieu dans lequel sont les cellules, ce qui facilite l'ajout de substances chimiques en vue d'un traitement. Les déplacements verticaux dans l'échantillon sont effec-

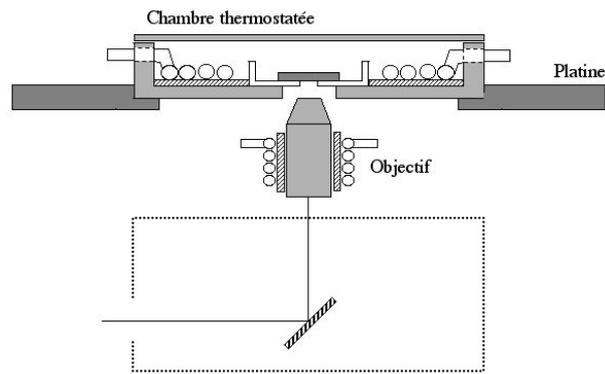


FIG. II.2.5: Schéma du microscope équipé du système de régulation de température par circulation d'eau.

tués grâce à un moteur pas-à-pas qui fait varier la distance entre l'objectif et l'échantillon. Le pas minimal en hauteur est de $0,1 \mu\text{m}$. Nous avons utilisé dans notre étude un objectif 63x d'ouverture numérique 1,25 à immersion à huile (Plan Neofluar, Zeiss).

L'utilisation d'un microscope standard permet de conserver tous les avantages d'un microscope classique, notamment la possibilité d'observer les échantillons en épifluorescence avec une lampe à mercure ou bien en contraste de phase, et de passer très facilement d'un mode d'observation à l'autre.

Pour l'étude des cellules vivantes, nous avons adjoint au microscope une chambre thermostatée se plaçant sur la platine, dans laquelle les échantillons sont conservés à la température constante de 37°C (la pièce étant, elle, à environ 22°C). Le fonctionnement de la chambre repose sur un système de circulation d'eau chaude. Nous avons construit une plaque de cuivre comportant une spirale de tube de cuivre sur le dessus, pouvant se loger dans la chambre comme nous pouvons le voir sur la figure II.2.5. Ce tube est relié à un bain-marie qui régule la température de l'eau circulant dans le tube. Une autre spirale est placée autour de l'objectif pour le chauffer et éviter les gradients de température qui pourraient entraîner des mouvements de l'échantillon.

L'échantillon est mis en place dans un porte-échantillon spécialement adapté. Ce porte-échantillon est constitué d'un réceptacle, d'un joint torique et d'une bague fileté venant faire pression sur le joint pour assurer l'étanchéité de l'ensemble. La lamelle est placée entre le fond du réceptacle préalablement enduit de vaseline et le joint torique. Le porte-échantillon est placé ensuite dans la chambre thermostatée.

Détection : La fluorescence provenant de l'échantillon doit d'abord être sélectionnée en longueur d'onde pour ne détecter que celle provenant du (ou des) fluorophore(s) utilisé(s). La figure II.2.6 schématise le système de sélection spectrale et de détection.

La lumière provenant de l'échantillon est séparée une première fois par un miroir dichroïque (D1) qui sépare la fluorescence de la lumière du laser (coupure à 650 nm). Elle passe ensuite

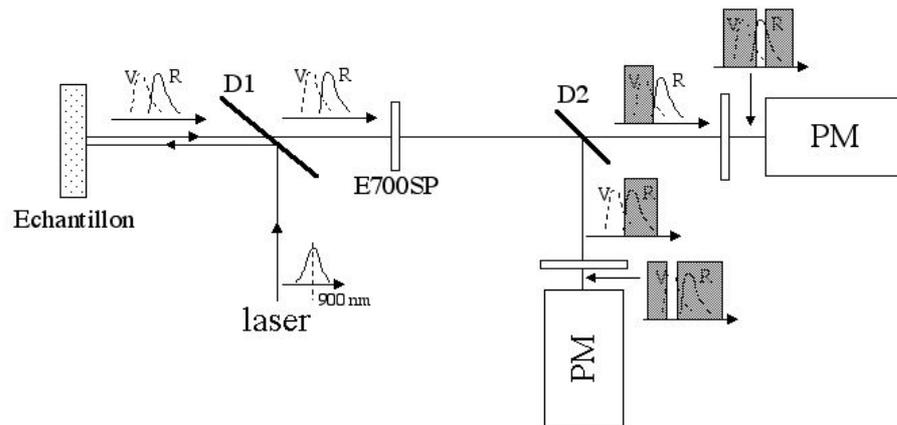


FIG. II.2.6: **Le système de détection de la fluorescence.** Les régions grisées représentent les parties du spectre rejetées par le filtre. On voit, par exemple, que le fluorophore vert (V) et le rouge (R) sont séparés par le miroir dichroïque D2.

dans un filtre permettant de rejeter la lumière laser résiduelle (ES700P, Chroma Technology), puis elle est partagée en deux par un deuxième miroir dichroïque (D2, longueur d'onde de coupure 575 nm) et est mesurée grâce à deux photomultiplicateurs (R928, Hamamatsu). Devant chaque photomultiplicateur, on peut placer deux filtres d'émission facilement interchangeables en fonctions des fluorophores utilisés. Nous avons essentiellement utilisé un filtre interférentiel passe-bande centré sur 510 nm, de 20 nm de largeur de bande (HQ510/20, Chroma), bien adapté à l'utilisation de la GFP.

II.2.1.2 Logiciel d'acquisition

Le logiciel commercial Fluoview (Olympus) permet de piloter le système de balayage via un boîtier électronique et d'acquérir les signaux provenant des photomultiplicateurs. Il transforme ensuite les données en une image utilisable directement par l'utilisateur.

L'utilisateur peut choisir entre les différents modes d'acquisition : image simple (XY), série temporelle (XYT), pile d'images à différentes profondeurs de l'échantillon (XYZ) ou encore série temporelle de piles d'images (XYZT). Plusieurs vitesses de balayage sont disponibles, fournissant une image plus ou moins moyennée. Le champ maximal visualisable avec l'objectif utilisé est d'environ 220 μm . Le pas minimum en z entre deux images est de 0,1 μm . Les images sont au format TIFF 12 bits, ce qui permet de mesurer l'intensité de la fluorescence sur 4096 niveaux de gris. La résolution maximale est de 1024x1024 pixels.

II.2.2 Montage expérimental pour la FRAP

Nous allons voir maintenant comment nous avons adapté le montage précédent pour la mesure quantitative de fluorescence et les expériences de FRAP. En effet, pour la FRAP, il nous

a fallu mettre au point une instrumentation spécifique et un logiciel dédié à ces expériences. Nous allons d'abord décrire la partie matérielle, puis nous aborderons la partie logicielle.

II.2.2.1 Matériel spécifique pour la FRAP

Principe

Pour les expériences de FRAP, nous devons passer de l'acquisition d'images à une mesure locale de la fluorescence et pouvoir moduler la puissance du laser. Nous voulons, en outre, pouvoir mesurer la fluorescence en un point, ou bien le long d'une ligne, ou encore dans une région définie d'une image, au cours du temps et en synchronisation avec le contrôle de la puissance. L'acquisition doit également être suffisamment rapide pour observer des changements d'intensité de l'ordre de la milliseconde.

Pour cela, il nous faut un moyen de moduler la puissance du laser rapidement et un système d'acquisition adapté, tout en conservant les fonctionnalités du microscope pour pouvoir faire une image de l'échantillon et choisir la région où l'on veut faire la FRAP. La figure II.2.7 montre l'organisation des différents éléments constituant le montage.

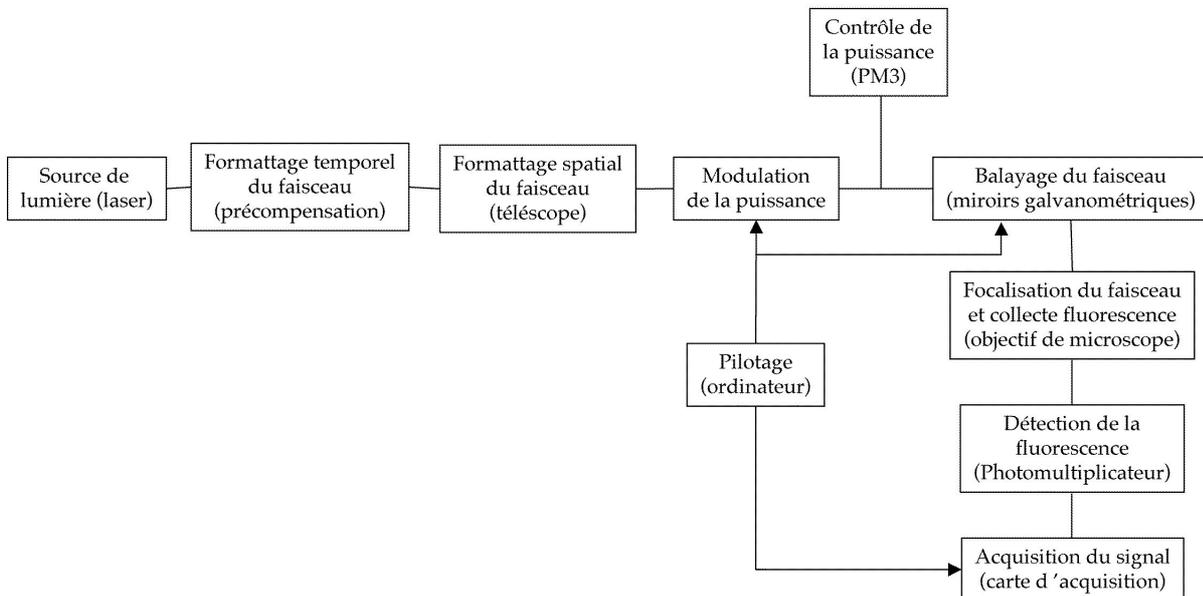


FIG. II.2.7: Schéma logique du dispositif expérimental pour la FRAP.

Description du montage

La figure II.2.8 représente le système expérimental. Nous ne décrivons ci-dessous que le matériel spécifique aux expériences de FRAP, c'est-à-dire la modulation de la puissance laser, son pilotage et l'acquisition des données.

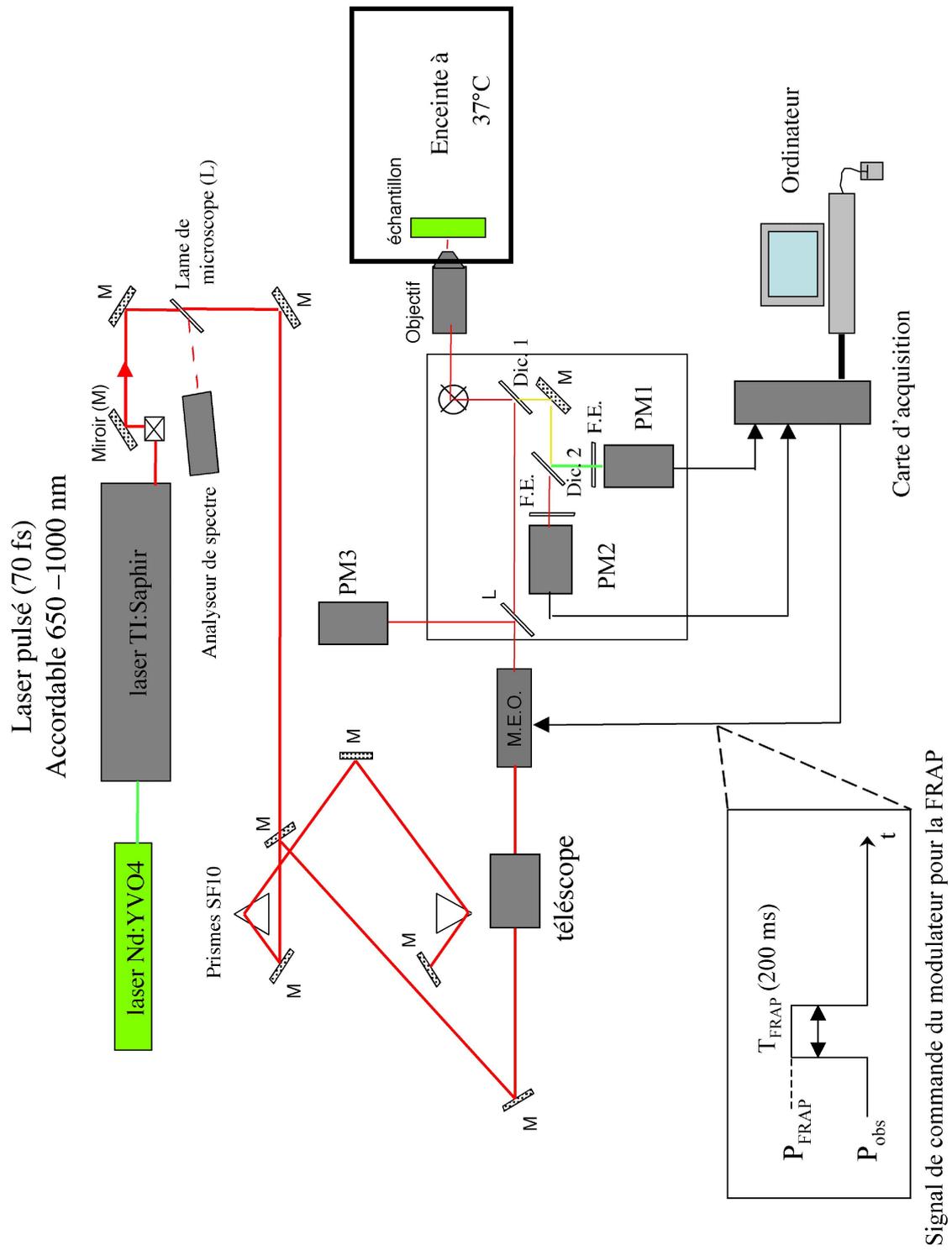


FIG. II.2.8: Schéma simplifié du dispositif expérimental pour la FRAP. M.E.O. : Modulateur électro-optique.

Modulation : La modulation de l'intensité est faite grâce à un modulateur électro-optique (Modèle 350-50, Conoptics). C'est une cellule de Pockels, c'est-à-dire que deux électrodes se faisant face induisent une variation d'indice anisotrope dans le cristal de KDP placé entre elles lorsqu'une différence de potentiel est appliquée. Cette variation d'indice n'affecte qu'une seule direction de polarisation, et induit une rotation de la polarisation de la lumière traversant le cristal. Un polariseur (analyseur) situé après le cristal transforme la variation de phase en variation d'amplitude. On module ainsi la transmission de la lumière traversant le dispositif.

En pratique, le modulateur peut être commandé par une tension entre -1 et +1 V facilement générable par la carte d'entrée-sortie ou le boîtier de pilotage. Cette tension modifie le rapport entre les tensions appliquées aux électrodes de la cellule de Pockels. Un réglage supplémentaire sur l'alimentation du modulateur permet de rajouter un décalage pour faire varier la gamme de valeurs disponibles avec une tension variant de -1 à +1 V car on ne peut pas toujours atteindre toutes les valeurs de transmission avec la tension de commande. Les réponses statique et dynamique du modulateur seront abordées plus loin.

Le pilotage s'effectue soit par le biais d'une sortie analogique de la carte d'acquisition, soit grâce à un boîtier dédié. Dans ce dernier cas, c'est le logiciel Fluoview qui gère l'acquisition du signal. Ces deux possibilités sont complémentaires car elles correspondent à différents modes de FRAP que nous allons décrire ci-après.

Pilotage du modulateur : Les deux systèmes de pilotage utilisés correspondent à des modes d'acquisition et de FRAP différents. La carte d'acquisition gère le modulateur uniquement pour les expériences de FRAP en un point. Le boîtier, lui, permet de commander la puissance de façon manuelle ou bien dans deux modes automatiques : le mode de FRAP suivant une ligne et le mode de FRAP dans une région rectangulaire de l'échantillon.

La carte d'acquisition pilote le modulateur par l'intermédiaire du programme spécifiquement écrit pour les expériences de FRAP, décrit plus loin. Elle fournit une tension entre -1 V et +1 V d'une forme définie par l'utilisateur. Dans notre cas, il s'agit d'un créneau simple entre la tension correspondant à la puissance d'observation et la tension correspondant à la puissance de photoblanchiment.

Le boîtier peut fonctionner dans deux régimes, manuel ou automatique. En mode manuel, le changement de tension de sortie (et donc de puissance) se fait par un simple interrupteur, le choix des tensions d'observation (V_{obs}) et de photoblanchiment (V_{FRAP}) se faisant grâce à deux potentiomètres. En mode automatique, les tensions sont également choisies grâce aux potentiomètres, mais le passage de l'un à l'autre se fait de façon automatique, en synchronisation avec le mouvement des miroirs galvanométriques. Il y a deux possibilités de déclenchement, soit suivant une bande dans l'image, soit en formant un rectangle ajustable en taille et position. La figure II.2.9 représente le principe de fonctionnement du boîtier en mode automatique.

Le basculement de la tension V_{obs} à V_{FRAP} se fait grâce à des comparateurs, montage élec-

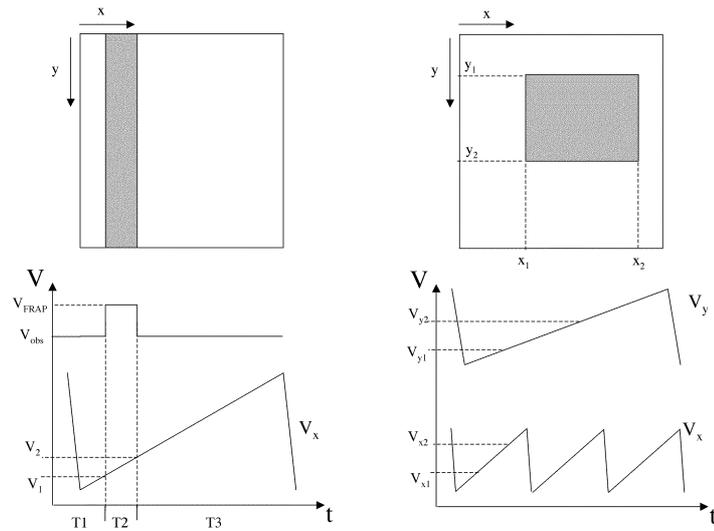


FIG. II.2.9: **Principe de fonctionnement du boîtier de commande.** A gauche, le mode de FRAP en bande ; à droite, le mode de FRAP dans une région rectangulaire.

tronique produisant un signal logique haut ou non, suivant le résultat de la comparaison entre une tension de référence et la tension appliquée à l'autre entrée. Dans le mode «bande», la comparaison se fait entre la tension de commande du miroir galvanométrique balayant suivant l'axe X et deux tensions (notées V_1 et V_2 sur le schéma) fixées par l'utilisateur grâce à des potentiomètres. Ainsi, quand la tension de pilotage du miroir est comprise entre V_1 et V_2 , la tension de commande du modulateur est V_{FRAP} et V_{obs} en dehors de cette zone. Ceci produit la bande grisée représentée sur la figure II.2.9. Dans le mode «rectangle», on a en plus une comparaison avec la tension du miroir Y, il faut donc quatre tensions de référence V_{x1} , V_{x2} , V_{y1} et V_{y2} .

Acquisition des données : L'acquisition du signal provenant du photomultiplicateur est faite soit par une carte d'acquisition dans le cas de FRAP en mode point, soit par le système Fluoview dans les autres cas (c'est-à-dire ceux où le modulateur est piloté par le boîtier électronique).

La carte d'acquisition utilisée est une carte d'entrées/sorties analogiques et numériques (PCI-MIO-16E-4, National Instruments) comportant 16 entrées analogiques, 2 sorties analogiques et 8 entrées/sorties numériques. La fréquence d'échantillonnage maximum est de 500 kHz pour un canal (250 kHz en acquisition bicanal) et la dynamique est de 12 bits. La fréquence d'acquisition utilisée dans nos expériences est généralement de 20 kHz. La carte est entièrement gérée par le programme dédié à la FRAP que nous allons décrire ci-dessous.

II.2.2.2 Logiciel dédié à la FRAP

Nous allons maintenant décrire le logiciel utilisé pour les expériences de FRAP en mode point. Nous avons écrit ce logiciel, appelé Fluofrap, spécialement pour cette application. Il est spécifique au système Fluoview en ce qui concerne le pilotage des miroirs galvanométriques et de la tension d'alimentation des photomultiplicateurs. A part cette partie, il pourrait être adapté à d'autres systèmes pour peu que ces dernières commandes soient accessibles.

Principe du programme

Le programme doit tout d'abord gérer l'interface entre l'image de l'échantillon fluorescent obtenue grâce au logiciel d'acquisition Fluoview et le système de pointage du faisceau laser dans l'échantillon. Pour cela, il utilise les coordonnées du point choisi affichées dans Fluoview et les convertit en valeurs de tension de commande des miroirs galvanométriques, afin de positionner le faisceau à l'endroit choisi.

Le logiciel doit également calculer et générer le signal de commande du modulateur suivant les paramètres fournis par l'utilisateur : puissance d'observation et de photoblanchiment, durée de la phase de pré-photoblanchiment (T_1), de la phase de photoblanchiment (T_2) et de la phase d'observation du retour de fluorescence (T_3). La figure II.2.10 représente la forme du signal produit.

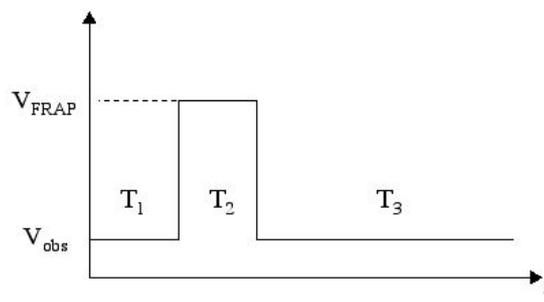


FIG. II.2.10: Forme du signal électronique de commande du modulateur électro-optique.

Il doit aussi gérer l'acquisition des signaux provenant du photomultiplicateur au cours du temps et la synchroniser avec le signal de commande du modulateur. L'utilisateur peut éventuellement répéter la séquence d'acquisition plusieurs fois et accumuler les données pour en calculer la courbe moyenne. Le programme permet ensuite d'enregistrer les données dans un fichier texte facilement importable par n'importe quel logiciel d'analyse de données. Le fonctionnement et l'utilisation du programme sont détaillés en annexe.

Synchronisation entrées/sorties

Sans synchronisation entre l'acquisition et le signal de commande, la phase de photoblanchiment apparaît à des temps aléatoires dans les données acquises. En effet, l'acquisition ne commence jamais au même moment par rapport à la génération du signal à cause des délais de calcul et de la compétition entre les différentes tâches en attente d'être traitées par le microprocesseur de l'ordinateur d'acquisition. Cette situation est déplorable car on attend une parfaite reproductibilité de la position temporelle des différentes phases (T1, T2 et T3) de l'expérience de FRAP, en particulier lors des acquisitions en mode répétition.

Nous avons donc mis en place une technique de synchronisation qui consiste à déclencher l'acquisition sur un signal indiquant le début du signal de commande du modulateur. En même temps que le signal de commande est généré, un signal numérique est envoyé vers une entrée analogique dédiée, puis lu par le programme qui déclenche alors l'acquisition. Cette méthode nous a permis d'obtenir une stabilité de la position temporelle inférieure à la microseconde. La figure II.2.11 représente la succession temporelle de ces événements.

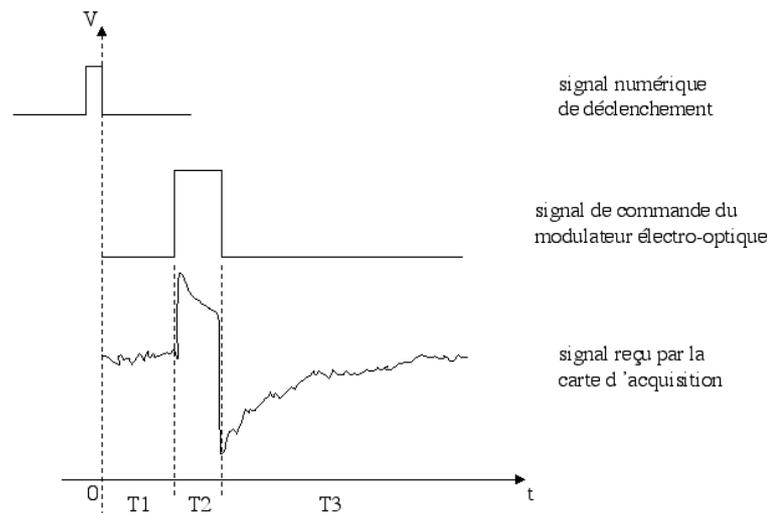


FIG. II.2.11: Synchronisation du signal de commande du modulateur et de l'acquisition.

II.2.3 Caractérisation de l'instrument

Dans le montage, certains éléments influent directement sur la fiabilité de la mesure de la fluorescence. C'est le cas du laser, du modulateur électro-optique et des photomultiplicateurs. Les étapes de modification du signal par ces éléments sont représentées sur la figure II.2.12.

En effet, pour les expériences de FRAP, il faut que le signal de sortie des photomultiplicateurs soit proportionnel à la concentration de fluorophores dans l'échantillon, ce qui implique que le système soit linéaire. De plus, il faut que la puissance du laser atteignant l'échantillon soit stable en dehors des phases de basculement de puissance. Une autre source d'artefacts

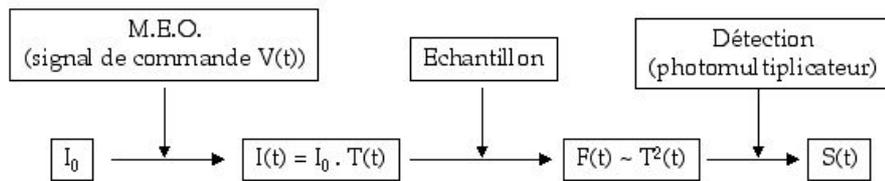


FIG. II.2.12: Schéma logique de l'influence du modulateur et de la détection sur les mesures de fluorescence. Le faisceau a, au départ, l'intensité I_0 , puis elle est modulée temporellement par la transmission du modulateur $T(t)$ commandé par un signal $V(t)$. Dans l'échantillon, l'intensité du laser produit de la fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à $T^2(t)$ à cause de la dépendance quadratique de la fluorescence en fonction de l'intensité d'excitation. Enfin, l'intensité de fluorescence est transformée en signal électrique mesurable $S(t)$ par le photomultiplicateur.

possibles vient du fait que nous imposons un changement brusque de la puissance lors de la phase de photoblanchiment, sous la forme d'un créneau. Il faut alors vérifier que l'ensemble du système réponde correctement à ce créneau.

Ces contraintes, nécessaires à une mesure quantitative de la fluorescence, ont été contrôlées en étudiant les réponses statique et dynamique du modulateur et des photomultiplicateurs. En suivant les notations de la figure II.2.12, on veut donc que les conditions suivantes soient remplies : $T(t) \propto V(t)$ et $S(t) \propto F(t)$.

Dans une dernière section, nous verrons enfin quelques limitations de notre système et quelles améliorations peuvent être faites.

II.2.3.1 Réponse du modulateur électro-optique

Réponse statique

Afin de pouvoir choisir la puissance d'excitation en appliquant une tension de commande au modulateur, nous avons fait une courbe de conversion puissance-tension. Cette courbe n'est pas linéaire, mais obéit à la loi de Malus : $T(V) = \sin^2(\Gamma_0 - \frac{\pi V}{2 V_\pi})$, où V est la différence de potentiel entre les deux électrodes de la cellule de Pockels, T la transmittance, Γ_0 l'angle de polarisation en l'absence de tension appliquée et V_π la tension nécessaire pour effectuer une demi-période de la fonction (c'est-à-dire un changement de phase de π). En effet, la différence de potentiel entre les électrodes dépend linéairement de la tension de commande pour ce modèle de modulateur.

Expérimentalement, nous ne pouvons obtenir qu'une partie de la courbe, dont un exemple est représenté sur la figure II.2.13. Nous pouvons cependant obtenir une puissance à la pupille arrière de l'objectif comprise entre 4 et 50 mW, ce qui suffit pour nos expériences. La courbe est très sensible à l'alignement du laser et la longueur d'onde utilisée, par conséquent il faut la mesurer pour chaque séance d'acquisition.

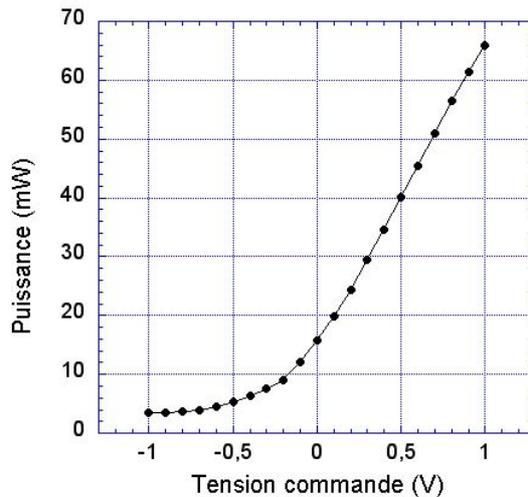


FIG. II.2.13: Courbe de conversion Tension-Puissance du modulateur électro-optique.

Nous avons également vérifié que la puissance à la sortie du modulateur était constante pour une tension de commande fixée grâce au photomultiplicateur PM3 (voir figure II.2.8) qui permet de mesurer la puissance du laser.

Réponse dynamique

Lorsqu'on soumet le modulateur à une commande en créneau, on observe une réponse non-linéaire. Cette réponse est différente pour les deux modèles dont nous disposons au laboratoire. L'un des modèles (350-80C, Conoptics) montrait des oscillations amorties à chaque transition d'une tension à l'autre. Nous avons choisi un modèle (350-50, Conoptics) qui ne présente pas d'oscillations. Il a néanmoins une réponse aux transitions brusques dont un exemple est représenté sur la figure II.2.14. Nous avons mesuré la réponse pour différentes valeurs de la durée du créneau. Nous avons pu déterminer que la réponse suit bien la commande pour des durées inférieures à 1 ms.

Nous avons également étudié la réponse fréquentielle du modulateur en le pilotant avec un générateur de fonction et en mesurant le signal avec une photodiode. La figure II.2.15 montre la dépendance de l'amplitude des oscillations en fonction de la fréquence lorsqu'on applique une commande sinusoïdale.

II.2.3.2 Réponse des photomultiplicateurs

Réponse statique

Nous avons vérifié que le signal électrique fournit par les photomultiplicateurs est bien proportionnel à l'intensité de lumière incidente. Néanmoins, lorsque l'intensité incidente est trop grande, on observe une saturation du signal de sortie à 6 V. Dans les expériences que

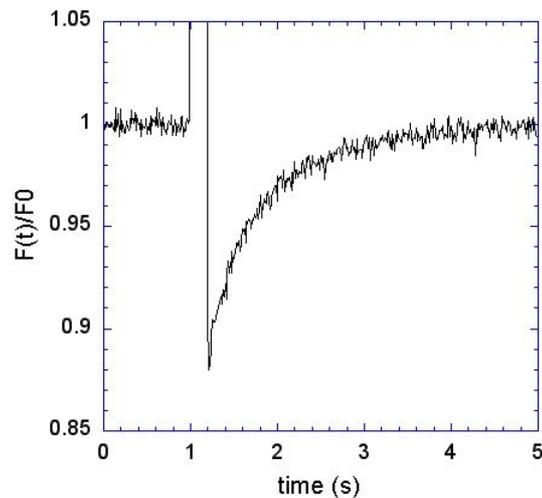


FIG. II.2.14: Réponse du modulateur électro-optique à un créneau en tension d'une durée de 200 ms. La courbe représente l'intensité du laser mesurée avec un photomultiplicateur (PM3) en fonction du temps. Les lignes verticales correspondent au début et à la fin de la phase de photoblanchiment.

nous avons faites, le signal était toujours en-dessous de cette valeur de saturation. Nous avons observé également une valeur minimale du signal d'environ 3 mV. Cela n'affecte pas la dynamique du signal qui est de 12 bits.

Réponse dynamique

Pour étudier la façon dont le photomultiplicateur répond à un brusque changement d'intensité, nous avons utilisé diverses méthodes, notamment une simple obturation du faisceau laser avec un écran (main ou carton épais). Nous avons alors constaté que nous obtenions des courbes montrant un lent retour à un signal constant après la perturbation. Nous avons également observé cette réponse avec une simple lampe et le photomultiplicateur, montrant ainsi qu'il s'agit de sa réponse propre. Elle consiste en une pente dans la partie haute du créneau et d'une remontée au début du retour à l'intensité de départ. Un exemple de ces courbes est montré sur la figure II.2.16.

Nous avons mieux caractérisé cette réponse à l'aide d'un montage constitué d'une diode électro-luminescente verte pilotée par la carte d'entrée/sortie comme source de lumière, placée devant le photomultiplicateur. Nous avons ainsi pu faire varier la durée du créneau et mesurer la réponse du photomultiplicateur tout en étant dans des conditions proches des expériences de FRAP. Nous avons pu déterminer que la pente est inférieure au bruit (environ 2% dans ces conditions) et qu'il n'y a pas de remontée lorsque le photomultiplicateur est polarisé à 900 V (tension recommandée par le constructeur), dans la gamme de durée du créneau entre 1 ms et 10 s. La figure II.2.17 montre un exemple de courbe obtenue avec une durée de 10 s. Ceci est bien compatible avec les conditions utilisées dans les expériences de FRAP.

Il faut noter cependant que cette source éventuelle d'erreur n'a jamais été évoquée dans

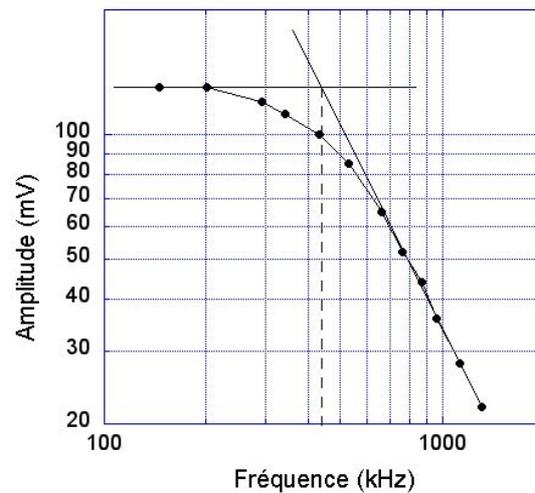


FIG. II.2.15: Réponse fréquentielle du modulateur électro-optique. La fréquence de coupure est d'environ 440 kHz.

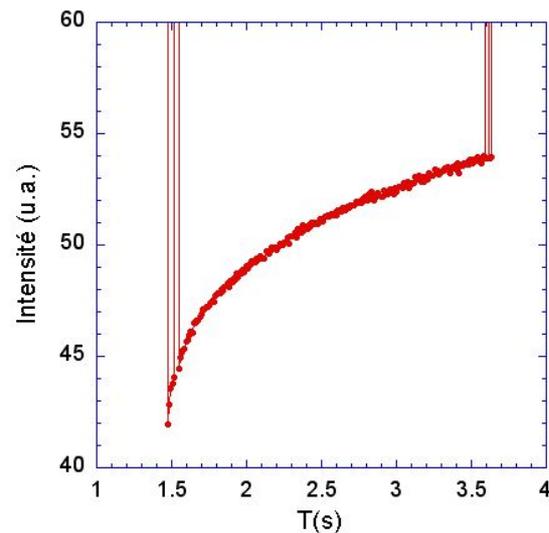


FIG. II.2.16: Réponse du photomultiplicateur lorsque l'on obture le faisceau laser avec un écran.

les articles consacrés à la FRAP et semble très peu connue des autres équipes de recherche. Nous pensons qu'il est nécessaire de vérifier la réponse des photomultiplicateurs pour chaque instrument destiné à cette technique sous peine d'invalider les mesures faites.

II.2.3.3 Correction de la réponse du modulateur

Afin de corriger les courbes expérimentales de la réponse dynamique du modulateur, nous avons mis en place un troisième photomultiplicateur (PM3) destiné à la mesure de l'intensité du laser après le modulateur (voir figure II.2.8). Ce PM3 est polarisé à la même tension que les autres, 900 V.

A l'aide de notre programme FluoFrap, nous avons alors fait une acquisition de 200 répéti-

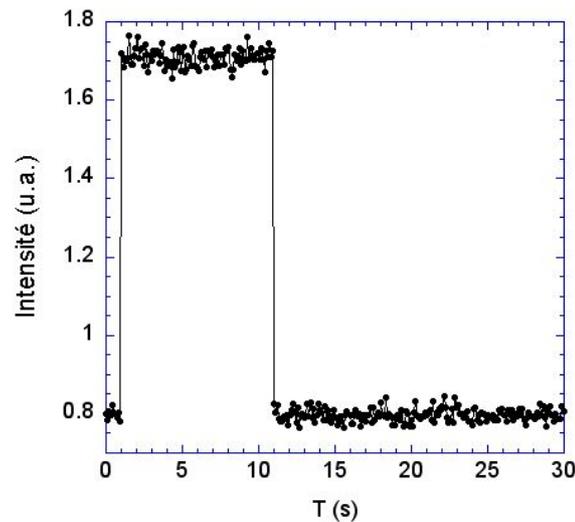


FIG. II.2.17: Réponse du photomultiplicateur à un créneau d'intensité d'une durée de 10 s. La lumière provient d'une diode pilotée par la le logiciel Fluofrap.

tions avec ce photomultiplicateur en utilisant les mêmes paramètres que ceux des expériences de FRAP. La courbe obtenue est une courbe de la puissance en fonction du temps, il faut donc d'abord l'élever au carré (car la fluorescence dépend du carré de l'intensité d'excitation à deux photons) pour pouvoir corriger les courbes de fluorescence. Il est également possible d'enregistrer le signal du PM3 en même temps que la fluorescence, puis de stocker systématiquement les données dans le même fichier de sortie.

Nous avons vérifié l'efficacité de la correction en mesurant l'intensité du laser sur le PM3 et le PM1 (celui utilisé pour la fluorescence) et en divisant l'un par l'autre. Il apparaît que le seul moyen de corriger correctement par division nécessite de normaliser les signaux entre 0 et 1. Ceci pose un problème lorsque l'on veut corriger la fluorescence car nous ne pouvons pas normaliser arbitrairement les données en ne sachant pas quelle composante du signal attribuer à la réponse du modulateur.

Néanmoins, nous avons étudié la variabilité des mesures de la réponse du modulateur avec le PM3 et les erreurs induites sur les données elles-mêmes par la correction en utilisant différentes acquisitions de cette réponse. Les résultats sont représentés sur la figure II.2.18. Le temps caractéristique de chaque courbe est déduit d'un ajustement par une fonction exponentielle croissante. Nous voyons que malgré un coefficient de variation de 15 % pour le temps caractéristique des courbes du PM3, seule une variation de 6 % sur les données corrigées est observée, valeur acceptable pour notre étude. Sans correction, on reste dans cette plage de variation, ce qui régle le problème que nous avons soulevé précédemment sur l'efficacité de la correction.

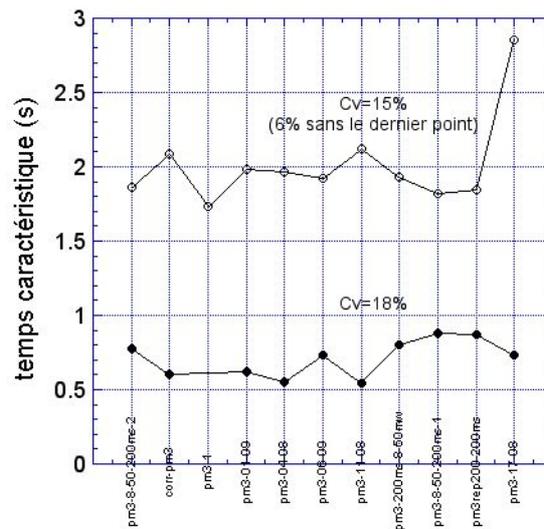


FIG. II.2.18: Variabilité des mesures de la réponse du modulateur. Effet sur la correction des données. La courbe en bas représente la variation du temps caractéristique de la remontée du signal du PM3 en fonction du jour d'acquisition. La courbe du haut montre la variation induite par la correction (division par le signal du PM3 au carré) sur le temps de remontée de la fluorescence.

II.2.3.4 Détermination de la réponse impulsionnelle spatiale (PSF)

Il est important pour bien caractériser le microscope de mesurer la PSF de chaque objectif utilisé, dans les conditions habituelles d'acquisition. En effet, la PSF définit le volume d'excitation dont la connaissance est importante pour l'interprétation quantitative des expériences de FRAP.

Une méthode de mesure souvent utilisée consiste à faire l'image d'une bille d'une taille très inférieure à la PSF, simulant ainsi une source ponctuelle. En pratique, nous avons utilisé des billes fluorescentes de 50 nm piégées dans un gel de polyacrylamide à 15 % préparé suivant le protocole suivant :

- 75 μl de solution acrylamide/bisacrylamide à 40% / 2,6 % ;
- 65 μl de Tris-HCl à pH 6,8 ;
- 50 μl d'eau ultrapure (mQ) ;
- 10 μl de billes en solution (dilution au $1/10^6$ de la solution de départ à 1% de solide) ;
- 1 μl d'ammonium persulfate (APS) à 10 % dans l'eau ;
- 0,2 μl de TEMED à 10 %.

L'ensemble est rapidement injecté entre une lame et une lamelle de microscope séparées par deux bandes de parafilm étiré. La polymérisation du gel se fait en quelques minutes et l'échantillon est prêt à être utilisé.

Nous avons ensuite fait une série d'image de cet échantillon à différents plans espacés de 0,1 μm et analysé la fluorescence dans une petite région au centre de la bille pour obtenir le profil d'intensité en z . La figure II.2.19 présente la PSF axiale obtenue pour l'objectif Plan Neofluar 1,25 NA 63x (Zeiss). La demi-largeur à $1/e$ est de 0,82 μm , si l'on ajuste les données avec une

gaussienne.

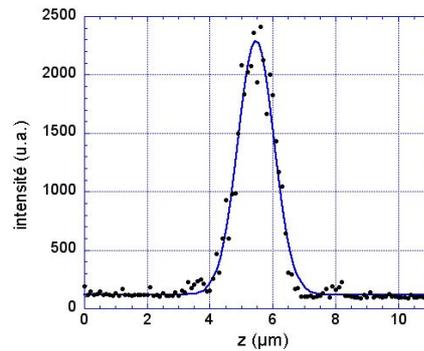


FIG. II.2.19: PSF axiale à deux photons de l'objectif Plan Neofluar 63x, NA 1,25 avec une longueur d'onde de 900 nm. La courbe continue représente l'ajustement gaussien des données avec une largeur à $1/e$ de $0,82 \mu\text{m}$.

Ces mesures ont cependant une limitation quant à leur utilité pour les échantillons biologiques. En effet, dans ce cas, le milieu est loin d'être homogène et proche d'un simple gel de polyacrylamide. Les variations imprédictibles d'indice de réfraction font qu'il n'est pas possible de réellement connaître la PSF dans ce type d'échantillon. De plus, la PSF varie en fonction de la profondeur dans l'échantillon. La figure II.2.20 montre la déformation introduite par le fait de la profondeur à laquelle se trouve la bille dans le gel, à cause de la différence d'indice entre le milieu d'immersion (ici, de l'eau) et le gel.

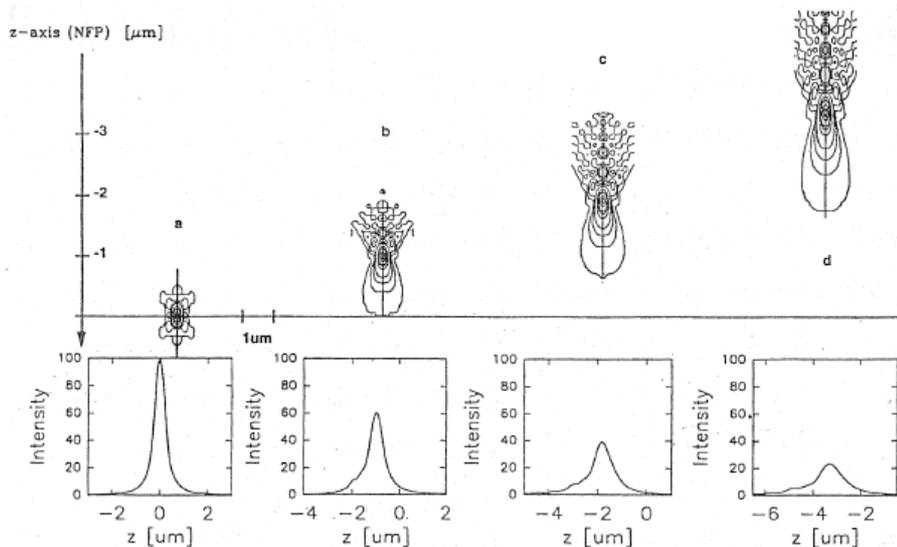


FIG. II.2.20: Effet de la profondeur de la bille sur la forme de la PSF mesurée (microscopie confocale). Courbes calculées pour un objectif d'ouverture numérique 1,3 à immersion à eau et pour un échantillon de rhodamine 6G en solution dans l'eau [Hell et al., 1993].

Il faut donc garder à l'esprit ces problèmes lorsque nous utiliserons les mesures de PSF précédentes pour interpréter des mesures sur des échantillons biologiques.

II.2.3.5 Limitations et améliorations

Nous allons aborder brièvement quelques limitations de notre instrument, limitations d'ordre général cependant, donc susceptibles d'être rencontrées par d'autres utilisateurs. Nous verrons dans le même temps quelles sont les améliorations que l'on peut apporter à notre système.

Pertes par réflexion

Nous avons été confrontés à de fortes pertes de puissance entre la sortie du laser et le porte-objectif du microscope. Ces pertes peuvent atteindre 50 %, notamment à cause des éléments optiques pas optimisés pour l'infrarouge. Il faut donc simplifier le chemin optique, utiliser des miroirs à dépôt d'argent qui ont une meilleure réflectivité à ces longueurs d'onde et des traitements antireflets pour les lentilles chaque fois que c'est possible. Par exemple, les lentilles du télescope ont un tel traitement pour l'infrarouge, et un cube de verre dans le microscope a été remplacé par un miroir, plus réfléchissant.

Amélioration du rapport signal sur bruit

Une autre limitation rencontrée en microscopie est la faible capacité de l'instrument à détecter tous les photons émis. Ceci altère le rapport signal sur bruit ce qui oblige notamment à augmenter la puissance d'excitation au risque d'avoir du photoblanchiment pendant l'observation de l'échantillon. Deux raisons instrumentales peuvent expliquer ce problème.

D'une part, l'émission étant isotrope, l'objectif n'en récupère qu'une partie correspondant au cône défini par l'angle solide maximal de collection de l'objectif. Celui-ci dépend de l'ouverture numérique de l'objectif et de l'indice de réfraction de l'échantillon et du milieu d'immersion² (voir Partie I). Une fois collectée par l'objectif, la fluorescence parcourt un trajet optique qui comporte inévitablement des pertes. Les pertes les plus notables sont les pertes par réflexion sur les éléments optiques, et par absorption et réflexion sur les filtres dichroïques. Ceci est d'autant plus vrai dans notre cas, que nous avons une configuration de détection «descannée»³ où la fluorescence suit un trajet optique relativement long.

Pour le premier cas, le mieux est de limiter au maximum le nombre d'éléments optiques sur le trajet de détection. La microscopie à deux photons permet de s'affranchir de la nécessité de descanner la fluorescence et donc d'une bonne partie des éléments présents dans un microscope confocal à cause de la présence du trou d'épingle (*pinhole*) garantissant le filtrage spatial. Il est possible de concevoir une détection dite «proximale» ou «non-descannée» tirant partie de cet avantage. Ce mode de détection est de plus en plus utilisé et améliore nettement l'efficac-

²Un saut d'indice entre le milieu d'immersion de l'objectif et l'échantillon tend à réduire la valeur effective de cet angle

³C'est-à-dire que la fluorescence parcourt le chemin inverse du faisceau laser jusqu'au dichroïque de séparation (voir figure II.2.8) et garde une position fixe après passage par les miroirs galvanométriques.

ité de détection, notamment pour l'imagerie de tissus épais ou d'autres milieux diffusants. La figure II.2.21 montre le principe d'une telle détection sur notre instrument.

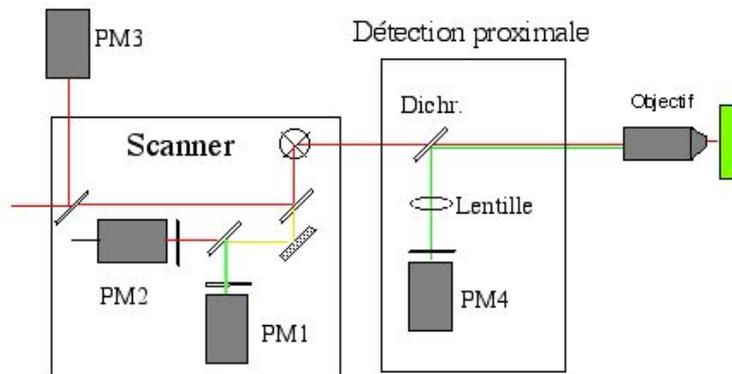


FIG. II.2.21: Principe d'une détection proximale.

Il s'agit simplement de placer un photomultiplicateur (PM4) juste après l'objectif à l'aide d'un miroir dichroïque transmettant la lumière du laser et réfléchissant la lumière visible. On place un filtre bloquant et un filtre d'émission devant le détecteur, comme pour la détection habituelle. La lentille fait l'image de la pupille arrière de l'objectif où le motif d'illumination est immobile car conjugué des miroirs galvanométriques. Le photomultiplicateur est placé au foyer image de sorte que la tache lumineuse soit immobile sur la photocathode. Dans le cas contraire, le signal mesuré serait entaché des inhomogénéités de sensibilité de la photocathode.

Chapitre II.3

Déroulement des expériences

II.3.1 Réglage de l'instrument

II.3.1.1 Calibration de la puissance

Une fois le laser aligné et centré, il faut mettre les miroirs galvanométriques en position centrée et calibrer la puissance transmise par le modulateur. Cette calibration, faite pour chaque expérience, est assurée en partie automatiquement par une fonction supplémentaire de notre programme Fluofrap.

II.3.1.2 Choix des paramètres d'acquisition

Afin de déterminer les paramètres essentiels pour les expériences, nous avons réalisé la mise au point directement sur des cellules vivantes. Nous avons d'une part choisi une puissance d'observation permettant un rapport signal sur bruit satisfaisant, d'autre part une puissance de photoblanchiment suffisante pour que la profondeur de photoblanchiment soit bien visible. Ce dernier réglage est, en fait, dépendant de la durée pendant laquelle on applique cette puissance, sachant que l'on ne veut pas que cette durée soit trop longue par rapport au temps caractéristique du mouvement des protéines étudiées.

Nous avons choisi les valeurs suivantes : $P_{obs} = 8 \text{ mW}$, $P_{bleach} = 50 \text{ mW}$, $T_2 = 200 \text{ ms}$ (durée de la phase de photoblanchiment) et $T_3 = 10 \text{ s}$ (durée de la phase de remontée). Ces paramètres ont été utilisés pour toutes les expériences de FRAP en mode point présentées dans ce mémoire.

II.3.2 Traitement des données brutes

Une fois les données acquises, quelques manipulations sont nécessaires pour les rendre exploitables. En particulier, il faut corriger la réponse du modulateur et l'effet du photoblanchi-

ment à la puissance d'observation. Ensuite, il faut normaliser les courbes de remontée de fluorescence, puis les moyenner. Nous avons également appliqué une procédure de filtrage sur les courbes pour en réduire le bruit.

II.3.2.1 Correction des données

Comme nous l'avons vu précédemment, la correction de la réponse du modulateur ne peut être faite de façon satisfaisante et l'effet de la correction des données sur le temps caractéristique de la remontée de fluorescence n'est pas significatif.

Un autre artefact est présent dans les données brutes. Il s'agit du photoblanchiment à la puissance d'observation. En effet, la figure II.3.1 montre que lorsque l'on fait des acquisitions en restant à la puissance d'observation (donc sans phase de photoblanchiment), la fluorescence décroît au cours du temps (sur des cellules fixées), ce qui est caractéristique du photoblanchiment puisque ce phénomène n'est pas observé pour des puissances suffisamment faibles.

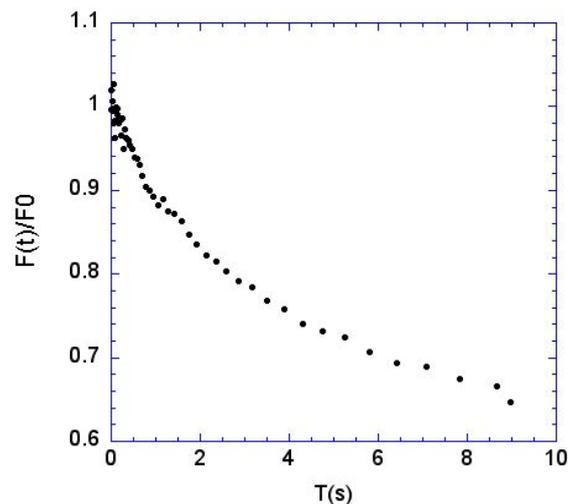


FIG. II.3.1: Mise en évidence du photoblanchiment à la puissance d'observation (8 mW) sur les cellules exprimant BBMI-GFP fixées.

En fait, c'est un problème général et souvent rencontré dès que l'on observe un échantillon fluorescent (par exemple, lors de l'acquisition de piles d'image en microscopie confocale) et donc aussi lorsque l'on illumine un seul point fixe. Une première approche pour corriger les données de cet artefact est de diviser les courbes de remontée par les courbes de photoblanchiment à la puissance d'observation acquises sur les cellules vivantes. Cette méthode est cependant incorrecte, car les courbes mesurées sur cellules vivantes ne comportent pas seulement du photoblanchiment, mais une contribution due au mouvement des protéines, de sorte que l'on corrige alors les courbes de remontée par une courbe contenant déjà l'information recherchée.

Une autre méthode consiste à utiliser les courbes obtenues sur des cellules fixées, qui ne

contiennent que de l'information sur le photoblanchiment de la EGFP, pour diviser les courbes de remontée. Cependant, un tel traitement ne tient pas compte du fait que les molécules bougent et que, par conséquent, on ne photoblanchit pas de la même façon toutes les molécules, et pas pendant le même temps. Il faudrait pouvoir suivre expérimentalement le mouvement de chaque molécule, dont dépend son photoblanchiment, ce qui n'est évidemment pas possible.

Au vu de ces conclusions, nous avons décidé de ne pas corriger les courbes de remontée pour le photoblanchiment, mais d'en tenir compte pour établir un modèle théorique de ces courbes. Ainsi, en ajustant les courbes théoriques aux courbes expérimentales, nous pourrions malgré tout déterminer les paramètres fondamentaux du mouvement. Nous verrons plus loin comment nous avons modélisé le photoblanchiment et les courbes de FRAP.

II.3.2.2 Normalisation et représentation graphique

La normalisation des données revêt une grande importance pour obtenir des données exploitables et pour l'interprétation que l'on veut en faire. En effet, si l'on ne normalise pas chaque acquisition, on augmente artificiellement l'écart-type de la distribution des points acquis à chaque pas temporel à cause des grandes variations de signal de fluorescence entre les différentes régions de la cellule et entre les différentes cellules, où le marquage est plus ou moins fort. La valeur de la moyenne prise sur cet ensemble d'acquisitions n'a pas beaucoup de sens non plus.

On peut choisir différentes normalisations, mais la plus sensée est la normalisation par rapport à l'intensité de fluorescence avant la phase de photoblanchiment. Elle permet d'accéder directement à la mesure de la profondeur de photoblanchiment et de la fraction mobile, deux paramètres importants des courbes de FRAP. Un autre type de normalisation est très utile : la normalisation entre 0 et 1, c'est-à-dire que l'on ramène le début de la courbe à 0 et la fin à 1. On peut ainsi étudier les différences de forme entre les courbes en s'affranchissant des différences d'amplitude. On l'a d'ailleurs déjà vu dans la Partie I lors de l'exposé de la théorie d'Axelrod et coll. Néanmoins, cette dernière normalisation suppose de connaître la valeur asymptotique $F(\infty)$ de la courbe de remontée de fluorescence, ce qui n'est pas toujours le cas dans nos expériences, surtout si l'on prend en compte le fait que le photoblanchiment observationnel peut modifier cette valeur.

Nous avons donc seulement utilisé la normalisation par rapport à l'intensité de fluorescence avant la phase de photoblanchiment. Nous avons normalisé chaque acquisition séparément avant d'en calculer la moyenne.

Les courbes moyennes ainsi obtenues ont été lissées par moyennage en fenêtres (*binning*) de sorte qu'il y ait un même nombre de points par décade en temps, c'est-à-dire que la moyenne temporelle est faite sur des intervalles de temps de taille augmentant exponentiellement. De ce fait, on obtient des courbes beaucoup plus lissées sans perte d'information au début de la courbe où un plus grand nombre de points sont nécessaires pour la définir à cause de la

variation rapide de son amplitude. On évite ainsi le défaut des méthodes habituelles de lissage de courbe, qui donnent un poids statistique excessif aux grandes échelles de temps.

Les données une fois traitées, nous avons utilisé deux types de représentation graphique : la représentation linéaire et la représentation semi-logarithmique en temps. Cette dernière offre l'avantage de mettre en évidence toutes les échelles temporelles, peu visibles en représentation linéaire, et permet en particulier de mieux comparer le début des différentes courbes. Elle permet également de visualiser facilement deux courbes représentant une réponse similaire qui ne diffèrent que par leur échelle de temps. En effet, dans cette représentation, deux courbes de même forme mathématique, mais de temps caractéristiques différents sont simplement décalées l'une par rapport à l'autre suivant l'axe des abscisses.

Néanmoins, cette représentation peut aussi mettre en avant des défauts dans les courbes qui pourrait être mal interprétés ou auxquels on accorderait trop d'importance alors qu'ils ne constituent qu'une petite partie de la courbe. La partie «temps long» de la courbe est également moins visible et il est plus difficile de voir si la courbe atteint un plateau ou continue à croître. C'est pour ces raisons que nous gardons dans certains cas les deux représentations.

Troisième partie

Résultats

Chapitre III.1

Analyse théorique des expériences de FRAP

Dans ce premier chapitre, nous allons aborder les bases physiques permettant d'interpréter les données expérimentales. Nous détaillerons également le modèle théorique que nous avons utilisé pour extraire les paramètres fondamentaux des courbes de FRAP.

III.1.1 Modélisation du système

III.1.1.1 Limitations des modèles existants

La description théorique des expériences de FRAP a toujours été basée sur deux hypothèses fondamentales : la durée de la phase de photoblanchiment (T_p) doit être courte par rapport au temps caractéristique du mouvement des molécules étudiées, et le photoblanchiment pendant la phase de remontée de fluorescence doit être négligeable.

Modèle Axelrod (1976)

Ce modèle est établi dans le cas d'un échantillon bidimensionnel, en excitation à un photon (voir partie II), avec les hypothèses précédentes. Il est essentiellement utilisable pour les expériences de FRAP sur des molécules confinées dans un plan (comme une membrane lipidique par exemple), dont le mouvement peut être diffusif, convectif ou un mélange des deux.

Modèle Brown (1999)

Le modèle développé par Brown et coll. est un modèle tridimensionnel pour des molécules purement diffusives, en excitation à deux photons. Il utilise cependant les mêmes hypothèses

sur la durée de photoblanchiment et le photoblanchiment observationnel. Il suppose, en outre, un milieu tridimensionnel infini.

Critique des hypothèses

Ces deux modèles ne sont pas adaptés à notre système et à nos conditions expérimentales. En effet, le modèle d'Axelrod et coll. est conçu uniquement pour une géométrie bidimensionnelle et ne peut pas être utilisé dans notre cas. Le modèle de Brown et coll. suppose lui un échantillon tridimensionnel infini, ce qui ne correspond pas non plus à la géométrie de notre système. De plus, les deux hypothèses fondamentales de ces modèles ne sont pas toujours applicables, comme c'est le cas ici.

La première hypothèse suppose que la durée de photoblanchiment est très courte par rapport au temps caractéristique du mouvement des molécules. Cette condition est réalisable dans le cas de molécules en solution en répétant la séquence de FRAP avec une phase de photoblanchiment brève et en moyennant les acquisitions successives de façon à obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant. Le taux de répétition des séquences doit cependant être suffisamment faible pour que les molécules aient eu le temps de remplir complètement la région photoblanchie pendant la phase de remontée. Par contre, dans le cas de cellules vivantes, il n'est possible d'utiliser la technique de répétition que dans le cas d'une molécule diffusant librement dans le cytoplasme. Elle n'est pas envisageable lorsqu'il y a des mouvements au sein de la cellule dans des échelles de temps du même ordre de grandeur que la durée de la mesure. De plus, elle conduit à une perte d'information sur la fraction immobile, seulement visible sur la première acquisition, les autres acquisitions ne concernant que la fraction mobile des molécules.

Dans notre cas, les protéines étudiées sont supposées être en interaction entre elles et avec d'autres molécules de la cellule, et les microvillosités ont un mouvement assez rapide qui interdit complètement la technique de répétition. Il faut faire une seule acquisition à la fois («*one-shot FRAP*»). Ceci implique une durée de photoblanchiment assez grande pour avoir une profondeur de photoblanchiment, et donc un rapport signal sur bruit, suffisante. Cette durée n'est plus forcément négligeable par rapport au temps caractéristique du mouvement et il nous faut en tenir compte lors de la modélisation des expériences.

Le photoblanchiment observationnel a presque systématiquement été négligé, notamment car la majorité des expériences de FRAP sont faites avec une région étendue. Ceci réduit le temps de résidence du faisceau en chaque point de l'échantillon et donc le photoblanchiment. Par contre, dans le cas de la FRAP ponctuelle que nous avons utilisée, le même volume submicronique est illuminé pendant toute l'acquisition et nous avons observé du photoblanchiment même pour des valeurs assez faibles de la puissance d'observation. Ceci n'a pas été observé par Brown et coll. car leurs mesures étaient faites sur des protéines diffusant librement et rapidement, compensant de ce fait les pertes par photoblanchiment (voir plus loin pour une discussion plus détaillée).

Nous voyons donc que les deux hypothèses fondamentales ne sont généralement pas justifiées dans le cas de la FRAP ponctuelle à deux photons sur des cellules vivantes. Nous avons donc développé un modèle plus adapté à notre étude et ne nécessitant pas les deux hypothèses habituelles. Nous pourrions ainsi interpréter des courbes expérimentales acquises avec une durée de photoblanchiment grande et du photoblanchiment observationnel.

III.1.1.2 Géométrie du système

Les microvillosités des entérocytes ont un diamètre d'environ $0,1 \mu\text{m}$ et une longueur d'environ $2 \mu\text{m}$. On peut donc les modéliser par une structure allongée, cylindrique. De plus, lors des expériences de FRAP, nous illuminons les microvillosités avec un volume de dimensions radiales environ 5 fois supérieures à celles d'une microvillosité ($0,5 \mu\text{m}$) ce qui nous rend peu sensibles aux variations de concentration radiale. De ce fait, nous avons décidé de modéliser les microvillosités par un axe unidimensionnel de longueur L (voir figure III.1.1).

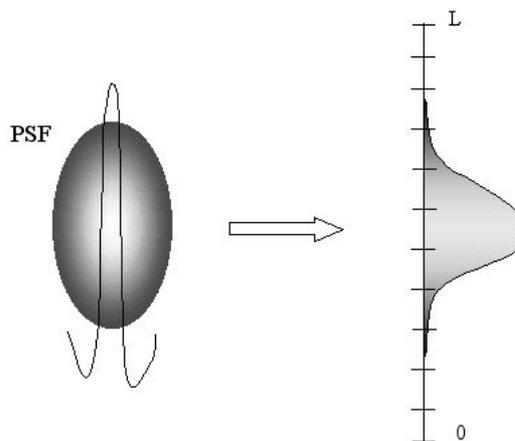


FIG. III.1.1: **Choix d'une géométrie pour la modélisation du système.** A gauche est représentée une microvillosité superposée au volume d'excitation (échelles non respectées), à droite figure l'axe unidimensionnel de longueur L et la PSF modélisée par une gaussienne.

Sachant que BBMI est distribué sur toute la longueur de la microvillosité, nous avons considéré une concentration initiale constante le long de l'axe. La composante axiale de la PSF est modélisée par une gaussienne de largeur à $1/e$ de $1,5 \mu\text{m}$ (d'après les mesures expérimentales montrées dans la partie précédente), centrée au milieu de l'axe (voir III.1.1). Nous avons choisi une longueur d'axe beaucoup plus grande que la taille de la PSF ($L = 80 \mu\text{m}$) de façon à éviter les effets de bord. Ces conditions ont été utilisées pour toutes les courbes présentées ici.

III.1.1.3 Modélisation du photoblanchiment

Pour caractériser le photoblanchiment dans nos conditions expérimentales particulières, nous avons effectué des expériences de FRAP à deux photons sur des cellules exprimant les

protéines liées à la GFP, fixées au paraformaldéhyde. Ce traitement immobilise les protéines de la cellule par réticulation, ainsi notre mesure du photoblanchiment n'est pas entachée d'un mouvement éventuel des fluorophores. Nous avons obtenu deux courbes de fluorescence : l'une correspondant au photoblanchiment pendant la phase de photoblanchiment, acquise avec une puissance de 50 mW, l'autre correspondant au photoblanchiment pendant la phase de remontée (photoblanchiment observationnel), acquise avec une puissance de 8 mW (voir figure III.1.2).

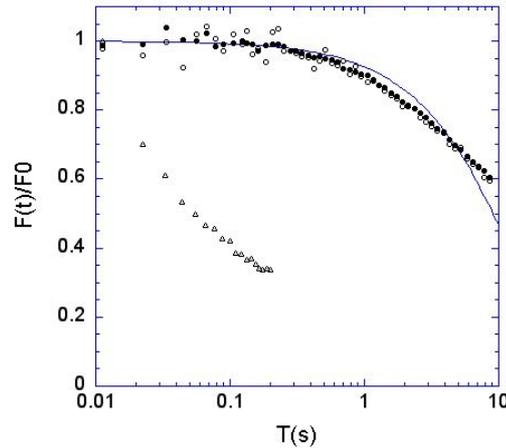


FIG. III.1.2: Mesure du photoblanchiment à la puissance d'observation (○ et ●) et à la puissance de photoblanchiment (Δ). Les courbes à 8 mW ont été acquises sur cellules fixées (●) et sur des cellules dont l'actine a été immobilisée (○).

Dans le premier cas, la décroissance de fluorescence est rapide et l'on perd environ 67 % du signal de départ en 200 ms, alors que dans le second cas, on perd seulement 40 % du signal au bout de 10 s et 67 % au bout de 35 s.

Nous avons modélisé la décroissance de fluorescence par une fonction exponentielle, comme cela est fait de façon classique, car cela permet d'écrire simplement l'équation différentielle régissant la perte de fluorescence par photoblanchiment. De plus, cela permet de calculer de façon suffisamment précise le profil de concentration à la fin de la phase de photoblanchiment, et donc de définir le profil de concentration initial de la phase de remontée (voir plus bas). La modélisation précise du photoblanchiment n'est de toutes façons pas possible à cause de la méconnaissance des phénomènes photophysiques regroupés sous le terme de photoblanchiment, en particulier pour la GFP¹.

En l'absence de mouvements et d'autres phénomènes photophysiques, nous avons donc choisi de décrire le photoblanchiment par l'équation suivante :

$$\frac{dC}{dt}(x, t) = -\alpha(x)C(x, t),$$

¹Il semble cependant que dans ce cas précis, il y ait un lien direct entre la dynamique de «clignotement» (*blinking*) observé sur des molécules uniques et le photoblanchiment observé sur un ensemble de molécules [Peterman et al., 1999]. Une étude détaillée de ce lien reste encore à faire...

où $\alpha(x)$ représente la probabilité de photoblanchiment en un point donné. En effet, cette probabilité dépend de l'intensité d'illumination mise au carré, qui a une forme gaussienne dans notre cas. Nous écrivons donc $\alpha(x) = \alpha(0) \exp(-4 \frac{x^2}{\sigma_x^2})$.

Concrètement, nous avons déterminé $\alpha(0)$ en faisant un ajustement de la courbe de décroissance de la fluorescence sur cellules fixées par une exponentielle décroissante de la forme $\exp(-\alpha(0)t)$ (voir figure III.1.2). Pour la phase de photoblanchiment (50 mW), il a été nécessaire de rajouter une valeur asymptotique non nulle (environ égale à 20 %) à l'exponentielle pour obtenir un ajustement correct ($a + b \exp(-\alpha(0)t)$), ce qui conduit à la valeur suivante : $\alpha(0) = 38,4s^{-1}$.

Pour la phase de remontée de fluorescence, nous voyons sur la figure III.1.2 que l'ajustement avec un photoblanchiment exponentiel n'est pas correct et conduit à une surestimation du photoblanchiment à 10 s d'environ 15 % du signal total. De plus, dans ce cas, l'influence du photoblanchiment sur les courbes limite la bonne reproduction des courbes expérimentales et peut fausser la détermination des paramètres de l'ajustement. Nous avons cependant utilisé la valeur $\alpha(0) = 0,076s^{-1}$ donnée par l'ajustement exponentiel pour le calcul des courbes théoriques.

III.1.1.4 Dynamique des molécules

Nous avons modélisé le mouvement des protéines par de la diffusion simple sur un axe unidimensionnel avec un coefficient de diffusion D constant. Si l'on considère un échantillon de fluorophores de concentration linéique $C(x, t)$, la variation de la concentration au cours du temps est donnée par l'équation aux dérivées partielles suivante (seconde loi de Fick) :

$$\partial_t C(x, t) = D \partial_{x^2}^2 C(x, t),$$

où D est le coefficient de diffusion à une dimension.

Si l'on prend en compte le photoblanchiment ayant lieu lors de l'illumination des molécules, l'équation d'évolution temporelle du système devient :

$$\partial_t C(x, t) = D \partial_{x^2}^2 C(x, t) - \alpha(x) C(x, t),$$

avec les mêmes définitions que précédemment. Il faut noter que $\alpha(x)$ est toujours positif ou nul, quelque soit x , et correspond bien à un terme de perte. Nous avons choisi des conditions aux bords de Neumann telles que $\partial_x C(0, t) = 0$ et $\partial_x C(L, t) = 0$ (conditions de flux nul), avec la condition initiale $C(0, x) = 1$ (protéines réparties de façon homogène).

La fluorescence générée par les molécules fluorescentes présentes dans la région illuminée est calculée d'après la formule suivante :

$$F(t) = K \int_0^L C(x, t) I_{exc.}^2(x, t) dx,$$

où K est une constante de proportionnalité et I_{exc} , l'intensité d'excitation.

L'équation d'évolution ne prend cependant pas en compte l'existence d'une fraction immobile parmi les protéines fluorescentes. Pour tenir compte de cette population qui contribue de façon non-triviale aux courbes de remontée de fluorescence, nous avons utilisé le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \partial_t C_m(x, t) = D \partial_{x^2}^2 C_m(x, t) - \alpha(x) C_m(x, t) \\ \partial_t C_{im}(x, t) = -\alpha(x) C_{im}(x, t) \end{cases}$$

La concentration totale est ensuite calculée suivant la formule : $C(x, t) = f \times C_m(x, t) + (1 - f) \times C_{im}(x, t)$ où f est la fraction mobile (comprise entre 0 et 1). La fluorescence résultante est calculée comme précédemment.

L'équation d'évolution du système n'a pas de solution analytique simple à cause de la dépendance spatiale de la probabilité de photoblanchiment $\alpha(x)$, de forme gaussienne, dont on ne peut pas calculer une intégrale définie. Nous avons donc choisi de résoudre numériquement l'équation, ce qui nous donne de surcroît la souplesse nécessaire à l'exploitation du modèle en faisant varier les différents paramètres et les conditions limites à notre guise, et de s'affranchir de l'hypothèse classique sur la durée de la phase de photoblanchiment, $T_{bl} \ll \tau_D$, nécessaire pour conduire un calcul analytique.

III.1.1.5 Calcul numérique

Afin de pouvoir résoudre numériquement l'équation d'évolution, il faut passer d'une description continue de l'espace et du temps à une représentation discrète. Ainsi, nous avons discrétisé l'axe unidimensionnel en Nx sites de longueur Δx (pas de discrétisation spatiale), numérotés suivant n variant de 0 à $Nx - 1$. Le temps est discrétisé en pas Δt tels que le rapport entre Δx et Δt obéisse à la relation d'Einstein. On calcule donc Δt par la formule suivante : $\Delta t = \frac{(\Delta x)^2}{2D}$. Les intervalles de temps seront notés k , avec k compris entre 0 et N_t .

La fonction d'illumination est alors discrétisée en l'évaluant en chaque site de l'axe. Nous voyons donc qu'il faut choisir un pas de discrétisation petit par rapport à la largeur de la PSF pour que les calculs soient suffisamment précis. En pratique, nous avons choisi $\Delta x = 0,02 \mu m$ pour la plupart des calculs ce qui permet une bonne définition de la forme de la PSF (voir figure III.1.3).

Nous avons ensuite choisi une méthode de discrétisation des dérivées spatiales et temporelles présentes dans l'équation d'évolution du système. Nous avons utilisé une méthode explicite classique de différences centrées spatialement, et vers l'avant temporellement (*F.T.C.S.* = *Forward Time Centred Space*). Les dérivées partielles deviennent donc : $\partial_{x^2}^2 C(x, t) \rightarrow \frac{1}{2(\Delta x)^2} (C_{n+1}^k - 2C_n^k + C_{n-1}^k)$ et $\partial_t C(x, t) \rightarrow \frac{1}{\Delta t} (C_n^{k+1} - C_n^k)$. Le terme de photoblanchiment au site n est calculé comme la moyenne des termes évalués sur les deux sites voisins ($n - 1$ et $n + 1$) afin d'améliorer

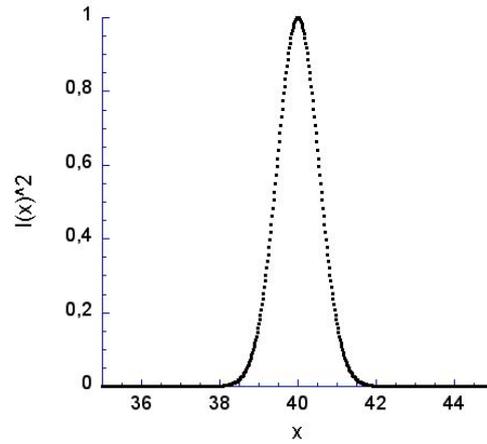


FIG. III.1.3: **Modélisation de la PSF par une gaussienne discrétisée spatialement, centrée sur l'axe.** Chaque point de la courbe représente la valeur de la gaussienne sur un site n de l'axe x représenté en dessous. Les extrémités de l'axe sont situés à $x = 0$ et $x = L = 80 \mu m$ et ne sont pas représentés ici.

la stabilité de l'algorithme. L'équation d'évolution discrétisée s'écrit donc :

$$C_n^{k+1} - C_n^k = \frac{\Delta t D}{2(\Delta x)^2} (C_{n+1}^k - 2C_n^k + C_{n-1}^k) - \frac{\Delta t}{2} (\alpha_{n+1} C_{n+1}^k + \alpha_{n-1} C_{n-1}^k),$$

ce qui, étant donnée la relation entre Δx et Δt , peut se réduire à l'équation suivante :

$$C_n^{k+1} = \frac{1}{2} (1 - \alpha_{n-1} \Delta t C_{n-1}^k) + \frac{1}{2} (1 - \alpha_{n+1} \Delta t C_{n+1}^k).$$

Les conditions aux bords s'écrivent :

$$C_0^{k+1} = \frac{1}{2} (1 - \alpha_0 \Delta t C_0^k) + \frac{1}{2} (1 - \alpha_1 \Delta t C_1^k),$$

et

$$C_{N_x-1}^{k+1} = \frac{1}{2} (1 - \alpha_{N_x-2} \Delta t C_{N_x-2}^k) + \frac{1}{2} (1 - \alpha_{N_x-1} \Delta t C_{N_x-1}^k).$$

La fluorescence résultante est ensuite calculée suivant la formule suivante :

$$F^k = \sum_0^{N_x-1} C_n^k \exp(-4n^2/\sigma_x^2).$$

Nous avons écrit un programme en langage C-ANSI pour calculer la concentration et la fluorescence au cours du temps, pendant la phase de photoblanchiment et la phase de remontée.

III.1.1.6 Simulation des expériences de FRAP

A l'aide du programme précédent, nous avons pu simuler des expériences de FRAP dans notre système modèle. Nous avons étudié l'évolution de la concentration et de la fluorescence dans les deux phases des expériences. Les courbes de remontée ont été calculées en négligeant le photoblanchiment observationnel ($\alpha_0 = 0$).

Phase de photoblanchiment

Pendant cette phase, le profil de concentration initialement plat se «creuse» au cours du temps sous l'effet du photoblanchiment (voir figure III.1.4 A.). L'amplitude et la forme du creux formé dépendent de la mobilité des protéines (τ_D) et de la durée de la phase (T_{bi}), le temps caractéristique de photoblanchiment (τ_{b-bi}) restant constant pour tous les calculs.

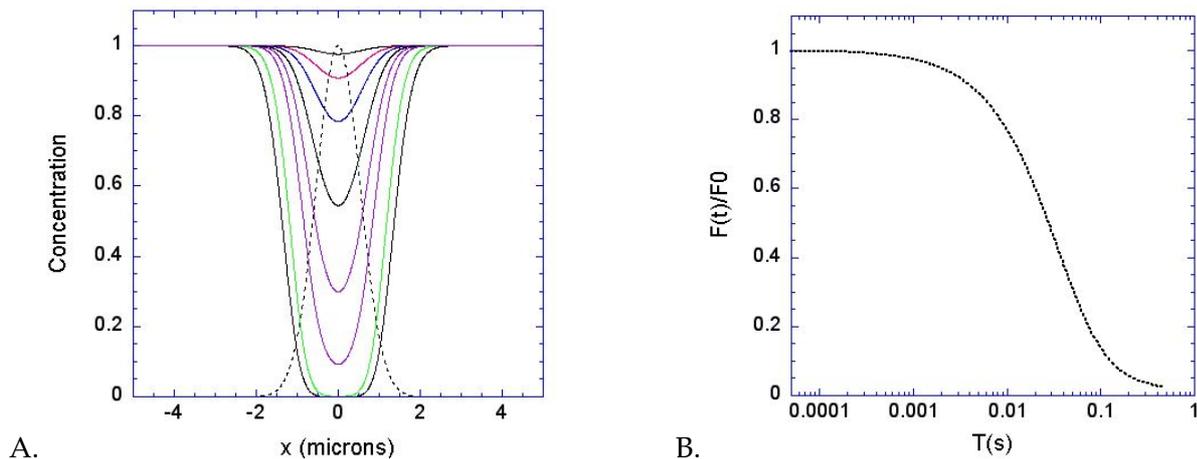


FIG. III.1.4: Simulation numérique de la phase de photoblanchiment d'une expérience de FRAP ($D = 0,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $T_{bi} = 0,5 \text{ s}$). A. Profil de concentration au cours du temps (les pointillés représentent la PSF), B. Courbe de fluorescence correspondante.

La fluorescence correspondante décroît suivant la loi exponentielle utilisée pour la modélisation montrant que le mouvement des protéines est négligeable avec les paramètres choisis (voir figure III.1.4 B.). Nous verrons plus tard d'autres cas où cela n'est plus vérifié.

Phase de remontée

Le profil de concentration initial de la phase de remontée est pris égal au profil de concentration à la fin de la phase de photoblanchiment. Lors de la phase de remontée, le creux se remplit en s'élargissant au cours du temps par échange avec les protéines non photoblanchies présentes hors de la région d'illumination (voir figure III.1.5). La fluorescence augmente donc de façon monotone au cours de ce remplissage.

III.1.2 Caractérisation des conditions expérimentales

Nous allons maintenant mieux caractériser nos conditions expérimentales à l'aide du modèle théorique précédent. Nous verrons ainsi l'influence de la durée de la phase de photoblanchiment et du photoblanchiment observationnel sur les courbes de remontée de fluorescence lors des expériences de FRAP.

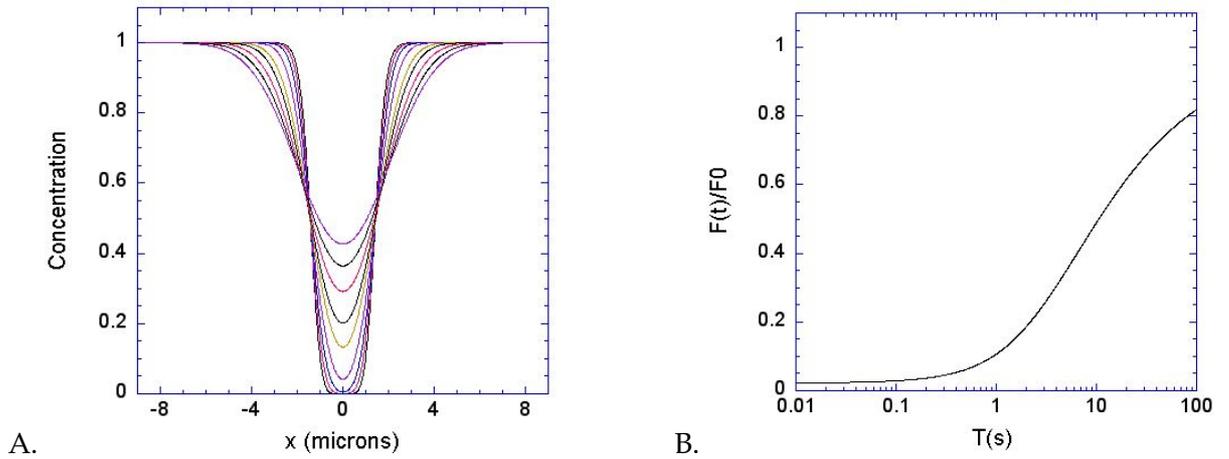


FIG. III.1.5: Simulation numérique de la phase de remontée d'une expérience de FRAP ($D = 0,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $T_{bt} = 0,5$ s). A. Profil de concentration au cours du temps, B. Courbe de remontée de fluorescence correspondante.

III.1.2.1 Effet de la durée de la phase de photoblanchiment

Dans les expériences de FRAP sur les cellules, nous avons utilisé une durée de la phase de photoblanchiment assez longue pour avoir une profondeur de photoblanchiment suffisante et donc un bon rapport signal sur bruit. Cependant, lorsque cette durée devient trop importante par rapport au temps caractéristique du mouvement des molécules étudiées, les courbes de remontée sont modifiées par rapport au cas «idéal» (durée très faible). Pour mieux comprendre l'effet que cela peut avoir sur nos mesures, nous l'avons caractérisé plus précisément à l'aide des simulations numériques. Nous avons seulement fait varier le coefficient de diffusion et la durée de photoblanchiment.

Mise en évidence expérimentale

Nous avons fait des expériences de FRAP sur des molécules de EGFP en solution aqueuse (PBS) à $1,7 \mu\text{M}$. Le volume total de solution étant d'environ $100 \mu\text{l}$, nous pourrions considérer que nous faisons les mesures en milieu infini.

Lorsque nous faisons varier la durée de la phase de photoblanchiment, nous obtenons différentes courbes décalées en temps, comme nous le voyons sur la figure III.1.6. Une renormalisation de l'échelle temporelle permet de superposer les trois courbes, indiquant une différence uniquement temporelle, c'est-à-dire que le coefficient de diffusion effectif change avec T_p .

Pour mieux caractériser ce décalage, nous avons fait un ajustement des courbes acquises avec une durée T_p de 2 ms et de 200 ms avec les 5 premiers termes de la formule établie par Brown et coll. (ref) :

$$F(t) = F_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{m^{3/2} (-\beta)^n}{n!} \frac{1}{(m + bn + (bnmt/\tau_D))} \frac{1}{\sqrt{m + bn + (bnmt/(R\tau_D))}}$$

La figure III.1.7 montre les courbes ajustées avec cette formule.

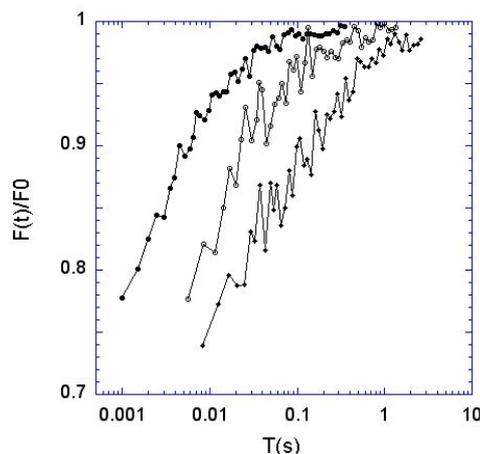


FIG. III.1.6: Variation de la courbe de remontée de fluorescence de la EGFP en solution en fonction de la durée de la phase de photoblanchiment. (\bullet : $T_p = 2$ ms, \circ : $T_p = 35$ ms, \diamond : $T_p = 135$ ms)

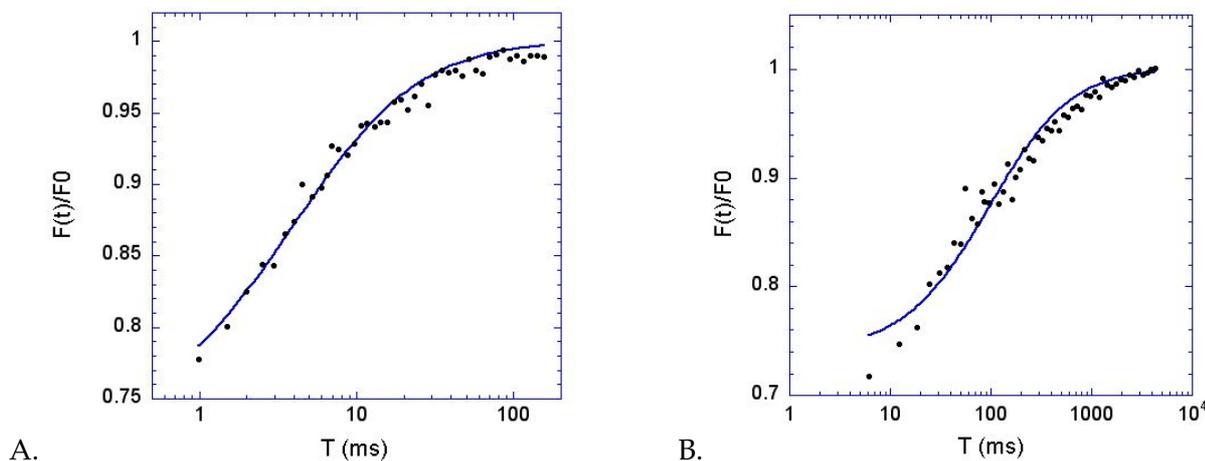


FIG. III.1.7: Ajustement des courbes de remontée de la EGFP en solution avec un T_p de 2 ms (A) et de 200 ms (B). Les courbes continues représentent les courbes calculées à partir de la formule de Brown et coll.

Pour la courbe faite avec un T_p de 2 ms, nous obtenons la valeur $\tau_D = 3,8 \pm 0,3$ ms, ce qui correspond à un coefficient de diffusion $D \approx 11 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, d'après la relation $D = w_r^2 / 8\tau_D$, avec $w_r = 0,6 \mu\text{m}$. Cette valeur du coefficient de diffusion est bien du même ordre de grandeur que les mesures faites par d'autres équipes ($\approx 80 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [Brown et al., 1999]. Pour la courbe avec un T_p de 200 ms, nous avons $\tau_D = 96 \pm 8$ ms, ce qui correspond à un coefficient de diffusion $D \approx 0,5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette grande différence est due, d'une part, à la qualité de l'ajustement (meilleure dans le cas $T_p = 2$ ms) et d'autre part au fait que lorsque la phase de photoblanchiment dure longtemps par rapport au temps caractéristique du mouvement (ce qui est le cas ici), la région photoblanchie s'agrandit artificiellement et rallonge le temps de remontée de fluorescence conduisant à une sous-estimation du coefficient de diffusion. Ce phénomène, que nous appellerons «déplétion» par la suite sera étudié plus en détail dans la section suivante.

Nous avons fait les mêmes mesures avec la EGFP exprimée dans des cellules Caco-2, ce qui donne un marquage cytoplasmique diffus. L'ajustement de la courbe acquise avec $T_p = 200$ ms

dans le cytoplasme des cellules Caco-2 donne $\tau_D = 72 \pm 5$ ms ce qui correspond à un coefficient de diffusion $D \approx 0,6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, peu différent de la valeur trouvée en solution.

Déplétion en concentration

A l'aide de notre modèle théorique, nous avons étudié les profils de concentration au cours de la phase de photoblanchiment pour deux valeurs extrêmes de coefficient de diffusion avec une durée de photoblanchiment constante, égale à 500 ms. Ces deux cas correspondent à des cas typiques où il y a déplétion en concentration (D grand) ou non (D faible).

Pour une valeur faible de D , on observe que le profil de concentration se creuse au cours du temps tout en restant confiné dans la région d'illumination définie par la PSF (voir figure III.1.8 A.). Les molécules n'ont pas le temps de s'échanger avec le reste de l'échantillon et il n'y a pas de déplétion en concentration.

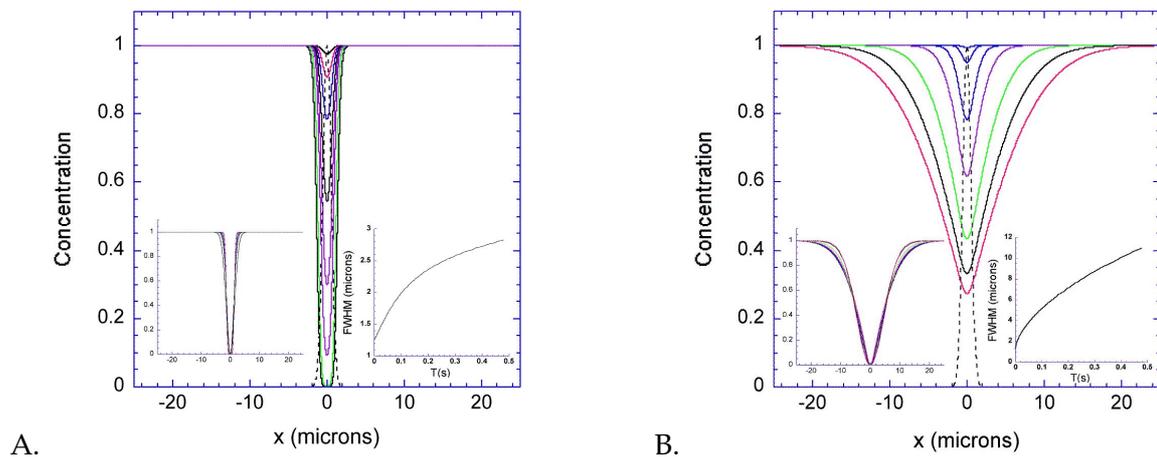


FIG. III.1.8: **Mise en évidence du phénomène de déplétion en concentration par calcul numérique.** A : Cas de diffusion lente ($D = 0,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), B : cas de diffusion rapide ($D = 80 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Les inserts à gauche représentent les profils de concentration renormalisés de sorte que la largeur à mi-hauteur soit identique pour tous. Ceux de droite représentent l'évolution de la largeur à mi-hauteur en fonction du temps (c'est-à-dire l'élargissement du profil). La courbe en pointillés représente la PSF.

Par contre, si l'on prend une valeur nettement plus grande du coefficient de diffusion (cas B), le profil se creuse moins et s'élargit considérablement à cause de l'échange des molécules photoblanchies avec les molécules intactes présentes en dehors de la région d'illumination (voir figure III.1.8 B). Le calcul de la largeur à mi-hauteur ($FWHM$) dans chaque cas montre la différence d'élargissement en présence et en absence de déplétion (voir figure III.1.9).

On peut voir l'effet de cette «déplétion» sur les courbes de fluorescence (figure III.1.10). Pour D faible, la courbe suit parfaitement la loi de photoblanchiment définie pour un ensemble de molécules immobiles, tandis qu'il y a un écart net pour D grand. Il faut noter que dans ce dernier cas la profondeur de photoblanchiment est plus faible également (on a pas le temps de photoblanchir toutes les molécules présentes avant que des molécules intactes ne remplissent

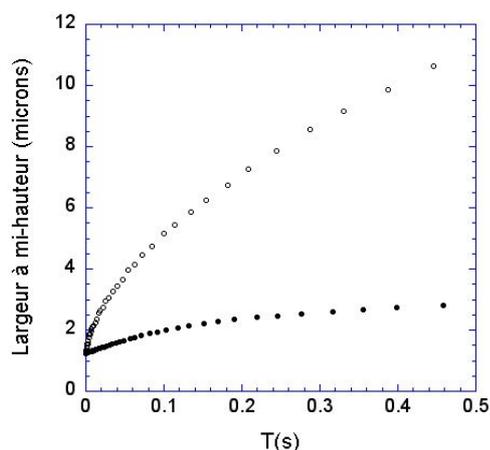


FIG. III.1.9: Comparaison entre l'élargissement en absence de déplétion (●) et avec de la déplétion (○).

la région d'illumination).

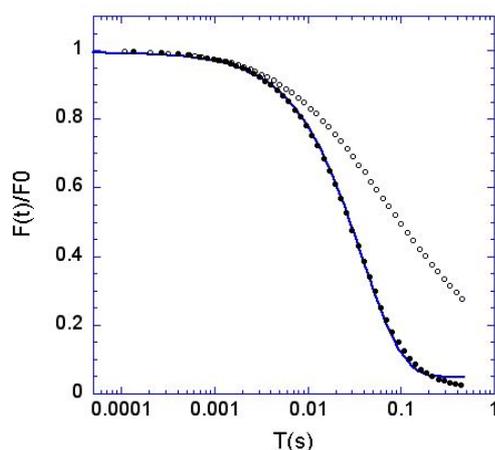


FIG. III.1.10: Comparaison entre la décroissance de fluorescence en absence de déplétion (●) et avec de la déplétion (○) pendant la phase de photoblanchiment. La courbe continue représente la loi exponentielle utilisée pour modéliser le photoblanchiment.

La remontée de fluorescence dépend de T_p

Cet effet de déplétion affecte évidemment les courbes de remontée de fluorescence. Nous avons donc étudié les variations des courbes de remontée en fonction de la durée de la phase de photoblanchiment pour les deux régimes de diffusion précédents.

Dans les deux cas, on note une augmentation de la profondeur de photoblanchiment avec T_p (voir figure III.1.11 A et B), bien qu'elle soit plus faible pour $D = 80 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Par contre, la valeur de la fluorescence atteinte au bout de 10 s de remontée diminue. L'absence de point d'inflexion au début des courbes dans le cas «rapide» indique que l'on perd de l'information sur le début de la remontée de fluorescence à cause de la déplétion sauf dans le cas $T_p = 2$ ms,

inférieur au temps caractéristique de diffusion.

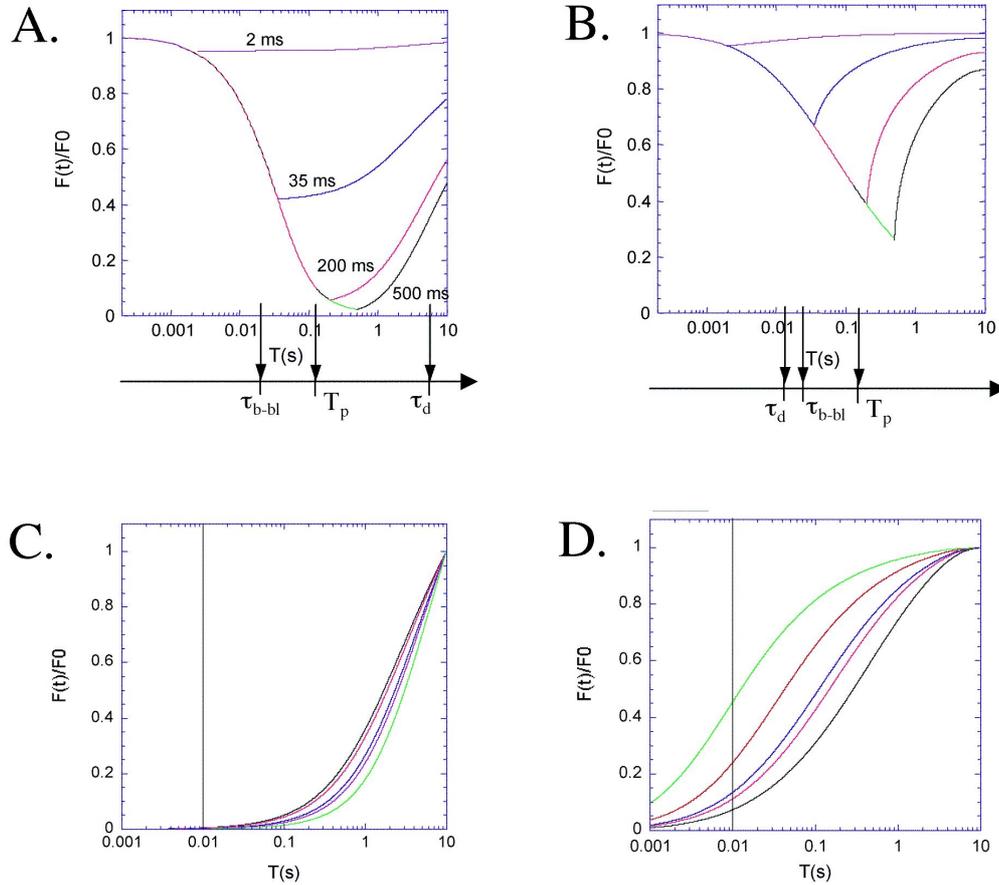


FIG. III.1.11: Effet de la durée de photoblanchiment sur les courbes de remontée de fluorescence. A gauche (A et C), le cas $D = 0,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; à droite (B et D), $D = 80 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les figures A et B représentent les courbes de photoblanchiment et leur courbe de remontée de fluorescence associée pour différentes valeurs de T_p (τ_{b-bl} : taux de photoblanchiment à la puissance de photoblanchiment, τ_d : temps caractéristique de diffusion). Les figures C et D montrent les courbes de remontée renormalisées en amplitude entre 0 et 1. Le trait vertical correspond au temps initial des mesures expérimentales.

De plus, la forme de la courbe de remontée change peu dans le cas lent, contrairement à l'autre cas où l'on note en plus une coupure haute-fréquence des courbes marquée par le trait vertical sur les figures III.1.11 C et D, qui correspond au temps initial des mesures expérimentales.

La remontée est également plus lente lorsque la durée de la phase de photoblanchiment est grande. Il apparaît donc que, si D et T_p sont grands (cas de déplétion), on a une sous-estimation du coefficient de diffusion, comme nous l'avons observé expérimentalement. Ceci s'explique facilement par le fait que le profil de concentration forme un creux nettement plus large et mettra donc plus longtemps à se remplir de molécules non photoblanchies.

III.1.2.2 Effet du photoblanchiment observationnel

Nous avons vu que dans nos conditions expérimentales, il y avait du photoblanchiment à la puissance d'observation. Nous avons donc utilisé notre modèle, malgré les problèmes rencontrés pour modéliser correctement le photoblanchiment, pour explorer l'influence du photoblanchiment observationnel sur les courbes de remontée de fluorescence.

On peut d'abord observer l'effet sur les profils de concentration. Si le mouvement des molécules n'est pas assez rapide, le photoblanchiment maintient un creux lors de la phase de remontée, qui finit par s'agrandir (voir figure III.1.12).

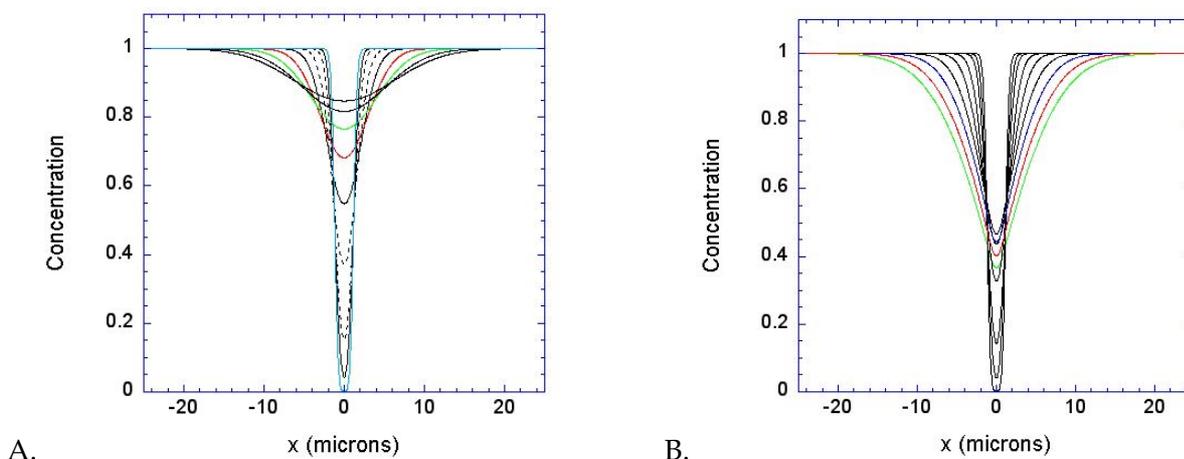


FIG. III.1.12: Evolution du profil de concentration dans le cas sans (A.) et avec photoblanchiment observationnel (B.)

En effet, lorsque le coefficient de diffusion n'est pas assez grand, le terme de photoblanchiment devient rapidement dominant dans l'équation d'évolution. De ce fait, la courbe de remontée de fluorescence peut décroître lorsque la diffusion n'est plus assez efficace pour équilibrer les pertes par photoblanchiment comme on le voit sur la figure III.1.13. Les courbes sans phase de photoblanchiment rejoignent ainsi les courbes de remontée de fluorescence. Elles représentent la compétition entre photoblanchiment et remplissage du creux du profil de concentration par les molécules intactes.

Nous avons fait les mêmes calculs pour différentes valeurs de D . Nous observons sur la figure III.1.14 que la déformation de la courbe a, dans cette gamme de valeurs, toujours lieu vers la fin de la remontée.

Il convient néanmoins de tempérer ces résultats qui semblent assez inquiétants pour les mesures de FRAP sur les cellules. D'une part, nous avons modélisé le photoblanchiment par une exponentielle, ce qui n'est pas exact (en particulier aux temps longs) et tend à surestimer le photoblanchiment observationnel et donc à déformer exagérément les courbes de remontée de fluorescence. D'autre part, les calculs ont été faits à 1 D alors que les mesures sont faites à 3 D, ce qui change beaucoup les possibilités d'équilibre entre la diffusion et le photoblanchiment.

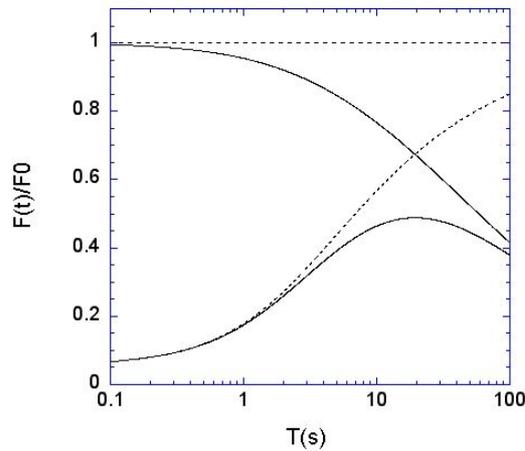


FIG. III.1.13: Comparaison entre la courbe de remontée de fluorescence sans (en pointillés) et avec du photoblanchiment observationnel (trait plein) pour $D = 0,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les courbes commençant à 1 correspondent à la simulation d'expériences de FRAP sans phase de photoblanchiment (profil initial de concentration plat).

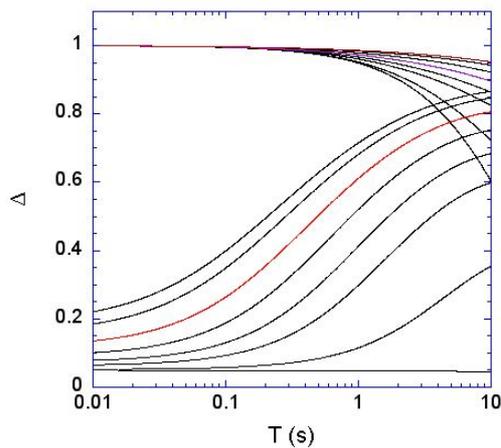


FIG. III.1.14: Variation des courbes de remontée de fluorescence et des courbes sans phase de photoblanchiment correspondantes en fonction du coefficient de diffusion.

En effet, dans les cas 1 et 2 D, on peut creuser infiniment loin le profil de concentration, il n'y a pas d'équilibre réel entre les pertes par photoblanchiment et l'apport par diffusion. En 3 D, on peut toujours équilibrer les deux. Cette différence fondamentale due à la dimensionalité du système implique, elle aussi, une surestimation du photoblanchiment.

De plus, l'effet du photoblanchiment observationnel a été estimé expérimentalement sur différentes protéines et montre que l'écart maximum à 10 s entre la courbe avec et sans photoblanchiment est d'environ 15 %. Les courbes de remontée de fluorescence étaient toutes monotones.

Nous verrons comment limiter les erreurs dues à la modélisation dans la section suivante.

III.1.3 Ajustement des courbes expérimentales

Pour déterminer les paramètres fondamentaux des courbes expérimentales (fraction mobile et τ_D), nous les avons ajustées avec les courbes théoriques calculées grâce à notre modèle. Nous avons donc calculé des courbes théoriques de remontée de fluorescence avec différentes fractions mobiles et coefficients de diffusion (voir figure III.1.15), tout en fixant les autres paramètres suivant les conditions expérimentales ($T_p = 200$ ms, temps de remontée = 10 s, taux de photoblanchiment déterminé expérimentalement).

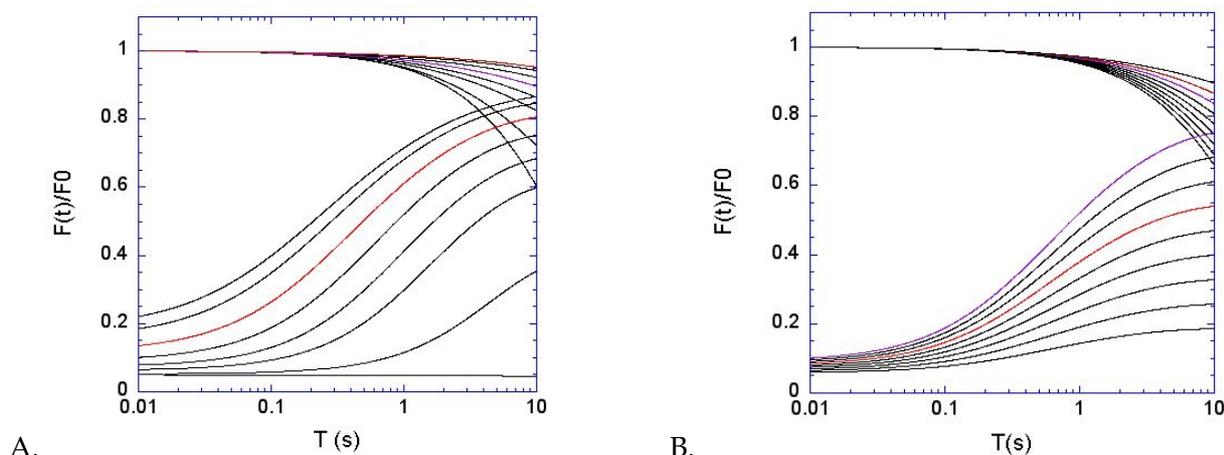


FIG. III.1.15: Courbes de remontée de fluorescence simulées en faisant varier soit le coefficient de diffusion (A.), soit la fraction mobile (B.). A. Le coefficient varie de 0 à $12 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. La fraction mobile est de 1 pour toutes les courbes. B. Le coefficient de diffusion est de $2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. La fraction mobile varie de 1 pour la courbe la plus haute à 0,2 pour la plus basse.

Nous avons ensuite utilisé la différence entre la courbe sans phase de photoblanchiment et la courbe de remontée de fluorescence (représentation différentielle) pour ajuster les courbes expérimentales car cela permet de diminuer l'erreur due à la surestimation du photoblanchiment (voir figure III.1.16). Bien que cette méthode ne soit pas «parfaite», elle permet d'extraire assez proprement la fraction mobile et le temps caractéristique du mouvement des courbes expérimentales.

Néanmoins, nous utiliserons également pour chaque courbe une mesure plus descriptive de ces deux paramètres, en mesurant directement la fraction mobile et le $t_{1/2}$, car l'ajustement théorique ne peut être fait sur toutes les courbes. En fait, la fraction mobile ne peut pas être définie parfaitement sur les courbes car elles n'atteignent pas toujours un plateau (la remontée n'est pas finie au bout des 10 s d'observation). De plus, le photoblanchiment à la puissance d'observation tend à diminuer cette fraction et ne nous permet pas de la connaître précisément. On peut seulement mesurer une fraction mobile «apparente», qui dépend de la durée d'observation. Elle ne correspond pas à une réelle fraction mobile, mais donne tout de même un élément de comparaison entre les courbes. Le même problème survient pour la détermination du $t_{1/2}$ des courbes. En effet, ce temps est défini comme le temps nécessaire pour que la

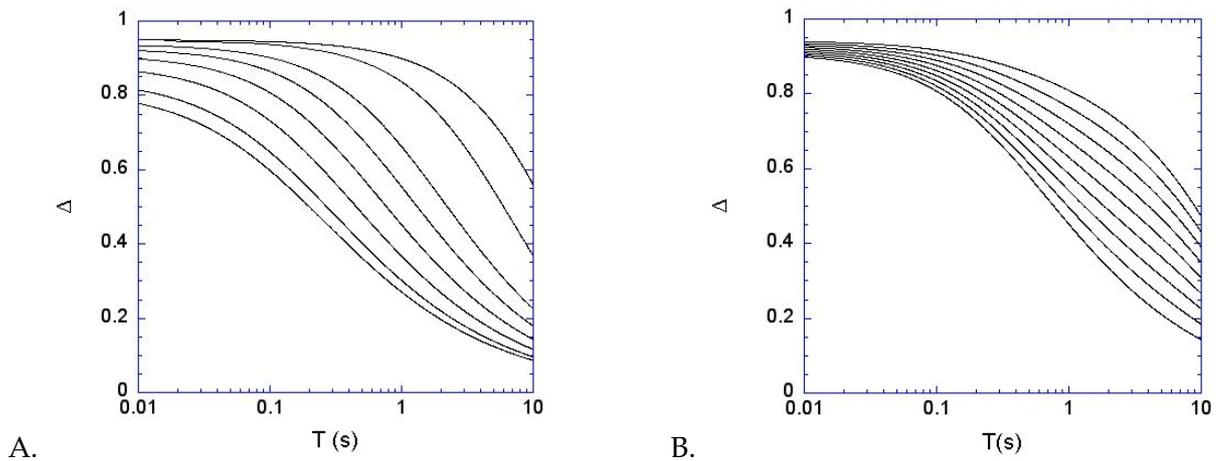


FIG. III.1.16: Différence entre la courbe sans phase de photoblanchiment et la courbe de remontée de fluorescence en faisant varier soit le coefficient de diffusion (A.), soit la fraction mobile (B.). A. La fraction mobile est de 1 pour toutes les courbes et D varie de 0,1 (courbe la plus à droite) à 12 (courbe la plus à gauche). B. Le coefficient de diffusion est de $2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et la fraction mobile varie de 0,2 (courbe la plus à droite) à 1 (courbe la plus à gauche).

moitié de la remontée soit effectuée. Cela implique de connaître la valeur asymptotique de la courbe ($F(\infty)$), ce qui n'est pas toujours le cas. Nous calculerons donc ce temps par rapport à la l'intensité de fluorescence mesurée au bout de 10 s de remontée afin d'avoir une indication de la mobilité de la protéine.

Chapitre III.2

Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse

Nous allons maintenant présenter les résultats issus des expériences de FRAP à deux photons sur les protéines du cytosquelette de la bordure en brosse des cellules Caco-2. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la dynamique de l'actine et de BBMI, deux des principaux constituants du cytosquelette susceptibles d'intervenir dans la dynamique de la bordure en brosse (voir Partie I). Les protéines étudiées, BBMI-GFP et actine-GFP, sont exprimées de façon stable dans les cellules Caco-2. Nous utiliserons également des cellules exprimant un domaine non fonctionnel de BBMI, BBMI Δ 730-GFP, dont nous avons déjà parlé précédemment.

Nous avons ainsi mesuré le mouvement de BBMI dans les microvillosités, puis étudié la sensibilité de cette dynamique à la concentration de l'ATP cellulaire et à la présence d'un inhibiteur de l'activité ATPase des myosines. La comparaison de cette mobilité avec celle de BBMI Δ 730-GFP nous a permis de déterminer la composante du mouvement de BBMI due à son activité motrice.

Nous avons mesuré en parallèle la mobilité de l'actine et comparé celle-ci à celle de BBMI, puis nous avons estimé leur interaction éventuelle par l'usage d'un agent stabilisateur de l'actine.

Enfin, nous avons fait des expériences de FRAP à la membrane latérale et comparé les dynamiques des protéines dans ces deux régions cellulaires.

III.2.1 BBMI-GFP a une activité motrice dans la bordure en brosse

Afin de mieux comprendre le rôle de BBMI dans la bordure en brosse, nous avons étudié sa dynamique à l'échelle du micromètre dans cette région. Pour cela, nous avons fait une grande série d'expériences sur les cellules Caco-2 exprimant BBMI-GFP, dans les microvillosités. La figure III.2.1 représente la moyenne de ces acquisitions avec une normalisation par rapport à

l'intensité avant la phase de photoblanchiment, ainsi que la moyenne d'une série d'acquisition faites sur des cellules fixées¹. Le niveau de départ des courbes est ramené à la valeur initiale de la courbe sur cellules fixées pour ne faire apparaître que la partie des courbes correspondant à une éventuelle mobilité. La courbe présentée est également lissée comme décrit dans la partie II. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. L'ensemble des courbes expérimentales de cette partie seront présentées sur ce modèle.

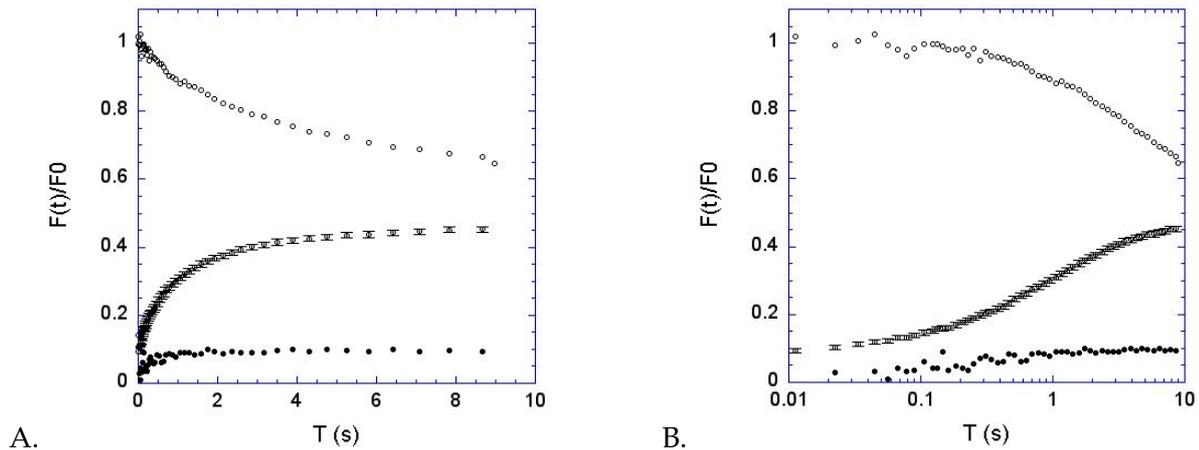


FIG. III.2.1: **Mobilité de BBMI-GFP dans les microvillosités des cellules Caco-2.** A : Courbe de remontée de BBMI-GFP en représentation linéaire, normalisée par rapport à l'intensité avant photoblanchiment (moyenne sur N=273 acquisitions), avec la courbe sans phase de photoblanchiment associée. B : mêmes courbes qu'en A., mais en représentation en échelle logarithmique en temps. La courbe du bas (●) représente les acquisitions faites sur cellules fixées.

La courbe de retour de fluorescence a une forme de type exponentielle croissante, avec une profondeur de photoblanchiment de $78,6 \pm 0,6 \%$. La fraction mobile «apparente» de $45 \pm 3 \%$, et le $t_{1/2}$ «apparent» est d'environ 0,7 s. Nous avons ajusté la courbe avec le modèle théorique, ce qui donne les valeurs suivantes : $D = 1,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 90 % (voir figure III.2.2).

La courbe de remontée sur cellules fixées permet de vérifier que nous observons bien la dynamique de la protéine et non un artefact expérimental. La faible remontée présente au début de la courbe est probablement imputable à la réponse du modulateur électro-optique et du photomultiplicateur.

Nous pouvons conclure de ces premières expériences que BBMI-GFP a un mouvement *in vivo* dans la bordure en brosse. Ce mouvement semble conforme à une loi de diffusion simple à cette échelle de temps, mais les faibles valeurs de vitesse mesurées pour BBMI *in vitro* ne permettent pas d'exclure une composante active dans la courbe de remontée. Il faut donc utiliser d'autres méthodes pour mettre en évidence une éventuelle activité motrice de BBMI. Il faut noter que c'est la première fois qu'un tel mouvement est montré, les seules expériences sur la

¹Au sens biologique du terme.

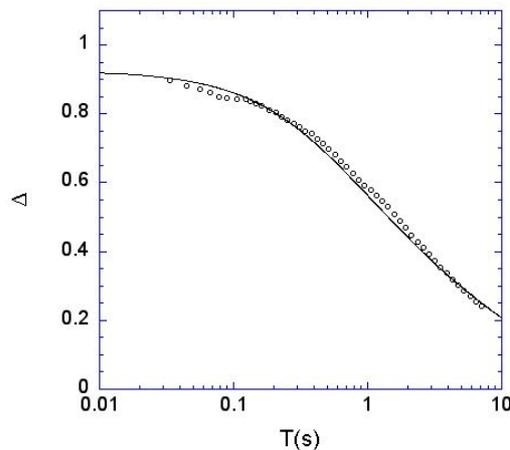


FIG. III.2.2: Ajustement de la courbe de remontée de fluorescence de BBMI par une courbe théorique de diffusion (en représentation différentielle). La courbe continue représente le calcul théorique avec $D = 1,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (ce qui correspond à un temps caractéristique τ_D d'environ 0,9 s) et une fraction mobile de 90 %.

mobilité de cette protéine ayant été faites *in vitro* sur des filaments d'actine isolés et non dans des microvillosités.

III.2.1.1 Le mouvement de BBMI-GFP est ATP-dépendant

Etant donné que BBMI est une protéine motrice, donc une enzyme hydrolysant l'ATP pour fournir un travail mécanique, nous nous sommes demandé si le mouvement de BBMI-GFP était «actif», et donc dépendant de la concentration intracellulaire en ATP, ou s'il était «passif», c'est-à-dire purement diffusif.

Pour cela, nous avons provoqué une diminution de la quantité d'ATP dans les cellules Caco-2 et regardé son influence sur le mouvement de BBMI-GFP. Comme la diminution de l'ATP cellulaire peut affecter d'autres processus, nous avons également mesuré l'effet de ce traitement sur le mouvement de l'actine-GFP et de BBMI Δ 730-GFP. Le protocole utilisé est le suivant : les cellules sont d'abord incubées pendant 15 minutes dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*), puis on ajoute 10 μM d'anti-mycine A (qui inhibe une réaction dans la chaîne de production de l'ATP dans les mitochondries) et 10 mM de 2-déoxyglucose (d'après [Wagner and Molitoris, 1997]). Les mesures sont faites environ 2 minutes après l'ajout de ces produits, pendant 20 minutes. La concentration d'ATP a été estimée en HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) et indique une diminution de 40 % de la concentration au bout des 20 minutes de traitement. L'observation des cellules en fluorescence n'a pas montré de changement morphologique appréciable durant la durée de traitement.

Pour mieux comparer l'effet de ce traitement sur les différentes protéines, nous avons représenté sur la figure III.2.3 le rapport entre les courbes après et avant traitement pour les trois protéines. Ainsi, dans cette représentation, une courbe plate indique qu'il n'y a pas d'effet sur la protéine. Les courbes présentées sont des moyennes sur la totalité de la durée du traitement.

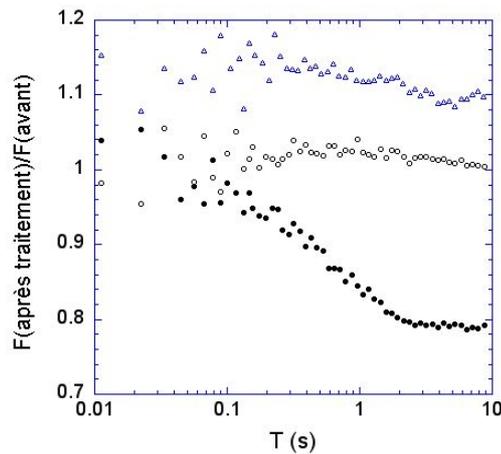


FIG. III.2.3: Effet de la diminution de la concentration d'ATP cellulaire sur le mouvement des protéines. Les courbes représentent le rapport entre la courbe de remontée de fluorescence avant le traitement et la courbe après traitement pour BBMI-GFP (●, 407 acquisitions), actine-GFP (○, 140 acquisitions) et BBMI Δ 730-GFP (Δ, 149 acquisitions).

Nous constatons que seule BBMI-GFP est affectée par le traitement, avec un effet marqué dans l'intervalle de temps 0,2 - 2 s de la courbe de remontée de fluorescence. Ceci indique que le mouvement de BBMI-GFP est bien dépendant de la concentration intracellulaire en ATP et suggère qu'au moins une partie de celui-ci est due à l'activité ATPase de la protéine.

III.2.1.2 Effet d'un inhibiteur de l'activité ATPase sur le mouvement de BBMI-GFP

Pour caractériser plus précisément la composante du mouvement de BBMI-GFP due à son activité ATPase, nous avons traité les cellules avec du BDM (2,3-ButaneDiol Monoxyde) en solution à 20 mM dans le milieu de culture. Les cellules ont été incubées 10 minutes avant les expériences, puis observées pendant 20 minutes. Le BDM est un inhibiteur de l'activité ATPase des myosines et l'on s'attend, si le mouvement est «actif», à voir un effet sur la courbe de remontée, soit un changement de la forme de la courbe dû à la perte de la composante active, soit une diminution globale du mouvement.

La courbe après traitement a une forme très semblable à celle obtenue avant traitement, mais décalée vers les faibles valeurs d'intensité de fluorescence (voir figure III.2.4).

La fraction mobile après traitement est de $45 \pm 6\%$, très similaire à celle avant traitement. La profondeur de photoblanchiment est de $83 \pm 0,4\%$ et le $t_{1/2}$ est d'environ 0,6 s. L'augmentation de la profondeur de photoblanchiment après traitement indique que la mobilité est réduite après traitement². L'ajustement de la courbe après traitement au BDM indique, en effet, une

²La profondeur de photoblanchiment dépend essentiellement du temps caractéristique de photoblanchiment du fluorophore, de la durée de la phase de photoblanchiment, de la fraction mobile et de la dynamique de la molécule étudiée. Ici, seuls les deux derniers paramètres varient, mais l'effet de la fraction mobile est faible. On considère donc qu'une différence de profondeur est surtout la signature d'une différence de mobilité (voir le premier chapitre de cette partie).

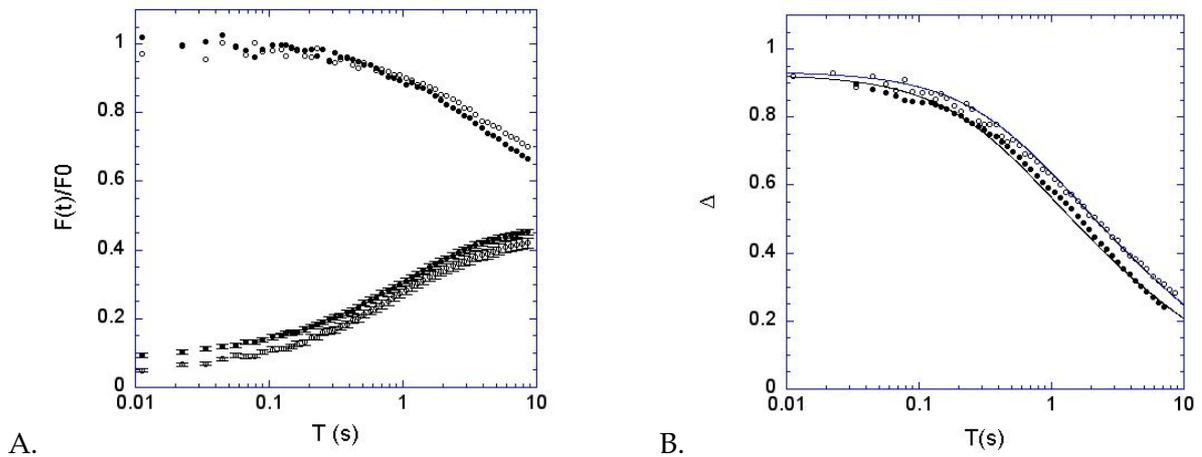


FIG. III.2.4: Effet du BDM sur le mouvement de BBMI-GFP dans les microvillosités. A : courbe de remontée de fluorescence de BBMI-GFP avant (●) et après traitement (○, 112 acquisitions), B : ajustement théorique en représentation différentielle avec $D = 0,8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 85 % pour la courbe après traitement.

mobilité significativement réduite ($D = 0,8$ contre $1,2$) et une fraction mobile légèrement plus faible (85 % contre 90 %). Les deux courbes sont bien ajustées par un modèle diffusif simple.

Il y a donc un effet du BDM sur le mouvement de BBMI-GFP, dans le sens d'un ralentissement. Le BDM agissant spécifiquement sur les myosines et non sur de nombreux processus cellulaires comme dans le cas de la diminution de la quantité d'ATP, ces résultats confirment donc le fait qu'une partie du mouvement de BBMI-GFP est dû à son activité ATPase.

III.2.1.3 Rôle du domaine moteur dans le mouvement de BBMI-GFP

Pour écarter un éventuel effet indirect de l'inhibition de l'activité des autres myosines de la bordure en brosse sur le mouvement de BBMI-GFP lors du traitement au BDM, nous avons comparé le mouvement de celle-ci avec celui de BBMI Δ 730-GFP. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie II, la protéine BBMI Δ 730 correspond au domaine carboxy-terminal de BBMI. Elle est dépourvue de domaine moteur, et donc des sites de liaison à l'actine et d'hydrolyse de l'ATP. Elle est localisée dans la bordure en brosse, comme BBMI, semble plutôt associée à la membrane plasmique d'après des expériences de fractionnement où elle est retrouvée avec la partie soluble par le Triton X100 (un détergent qui solubilise la membrane plasmique), alors que BBMI est retrouvée avec l'actine dans la partie non soluble (voir figure III.2.5). Son mouvement devrait donc correspondre à la composante du mouvement de BBMI indépendant de l'ATP.

La figure III.2.6 représente les courbes de remontée de fluorescence pour les deux protéines, dans les microvillosités.

La fraction mobile et la profondeur de photoblanchiment de BBMI Δ 730-GFP sont plus faibles que celles de BBMI-GFP, indiquant une mobilité plus faible. Le décalage entre les deux courbes est similaire à celui observé lors du traitement par le BDM. L'ajustement théorique

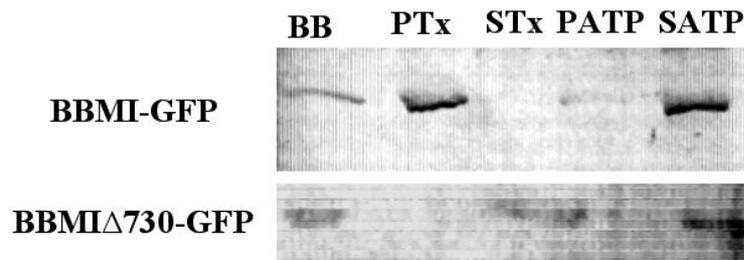


FIG. III.2.5: Réplique immunologique de fractions de bordures en brosse de cellules Caco-2 exprimant soit BBMI-GFP, soit BBMI Δ 730-GFP. La première colonne montre la présence des deux protéines dans la bordure en brosse (BB). Les colonnes PTx et STx montrent respectivement la présence des protéines dans la partie insoluble (P) ou soluble (S) au Triton X100. Les colonnes PATP et SATP correspondent à ces mêmes fractions après ajout d'ATP et indique que BBMI-GFP interagit de façon ATP-dépendante avec la partie insoluble qui contient les filaments d'actine.

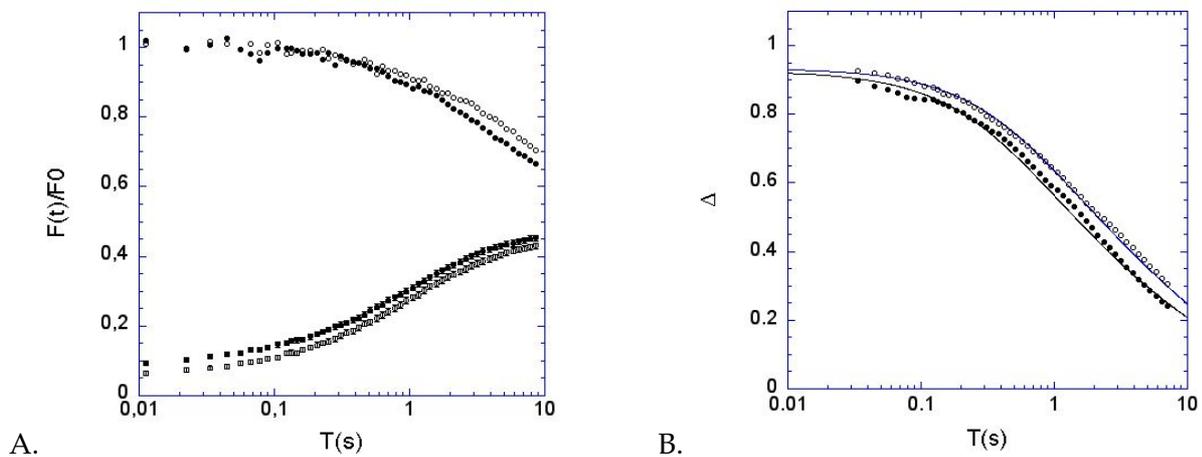


FIG. III.2.6: Comparaison entre le mouvement de BBMI-GFP et BBMI Δ 730-GFP. A : ● : courbe de remontée de fluorescence de BBMI-GFP, ○ : courbe de remontée de fluorescence de BBMI Δ 730-GFP (207 acquisitions), B : ajustement théorique en représentation différentielle avec $D = 0,8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 85 % pour la courbe de BBMI Δ 730-GFP.

confirme cette observation : la mobilité est réduite par rapport à celle de BBMI ($D=0,8$) et la fraction mobile également (85 %), comme pour la courbe de remontée de BBMI après traitement au BDM (voir figure III.2.6).

Si nous comparons maintenant directement les courbes de BBMI-GFP après traitement au BDM et celle de BBMI Δ 730-GFP, on voit qu'elles se superposent très bien (voir figure III.2.7), ce qui prouve que le traitement par le BDM a un effet bien spécifique sur le mouvement de BBMI-GFP.

Nous voyons donc que, lorsque l'on inhibe l'activité ATPase de BBMI par le BDM, le mouvement de BBMI-GFP est identique à celui du domaine carboxy-terminal de la protéine, ce qui indique que la différence entre les courbes de BBMI-GFP avant et après traitement est bien due à l'activité motrice de BBMI-GFP.

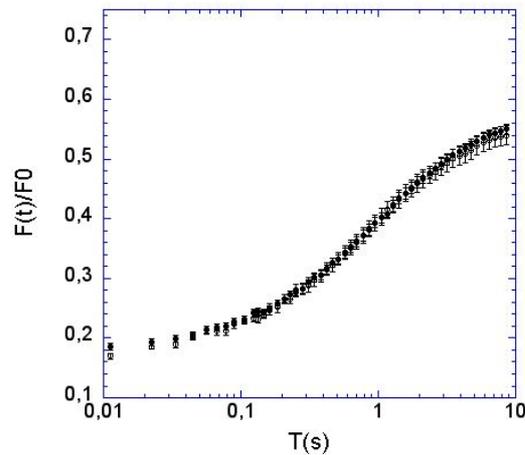


FIG. III.2.7: **Comparaison entre le mouvement de BBMI-GFP après traitement par le BDM et de BBMI Δ 730-GFP.** ● : courbe de remontée de fluorescence de BBMI-GFP après traitement par le BDM, ○ : courbe de remontée de fluorescence de BBMI Δ 730-GFP sans traitement.

Tous les résultats précédents concordent et montrent que BBMI-GFP a un mouvement actif dans les microvillosités des cellules Caco-2.

III.2.2 BBMI-GFP et l'actine-GFP ont une dynamique différente

Etant donné que BBMI est connue pour interagir avec l'actine *in vitro*, nous avons vérifié si une partie du mouvement de BBMI-GFP correspondait au mouvement de l'actine. Pour cela, nous avons d'abord comparé les courbes de remontée de fluorescence des deux protéines, représentées sur la figure III.2.8.

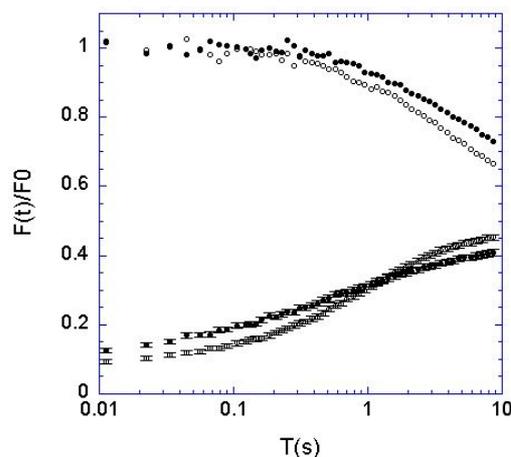


FIG. III.2.8: **Comparaison entre la dynamique de l'actine-GFP et de BBMI-GFP.** ● : courbe de remontée de fluorescence de l'actine-GFP (201 acquisitions), ○ : courbe de remontée de fluorescence de BBMI-GFP.

La courbe de l'actine-GFP est très différente de celle de BBMI-GFP et apparaît presque linéaire (avec une échelle temporelle logarithmique). La fraction mobile est plus faible que celle

de BBMI-GFP ($38 \pm 4 \%$), mais la profondeur de photoblanchiment moins importante ($75,5 \pm 0,8 \%$) indiquant que l'actine-GFP a un mouvement plus rapide que BBMI-GFP. Le croisement des courbes est uniquement dû à la différence de fraction mobile entre les deux.

On peut ajuster les deux courbes par un modèle purement diffusif avec $D = 1,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 90 % pour BBMI-GFP, et $D = 3,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 58 % pour l'actine-GFP (voir figure III.2.9).

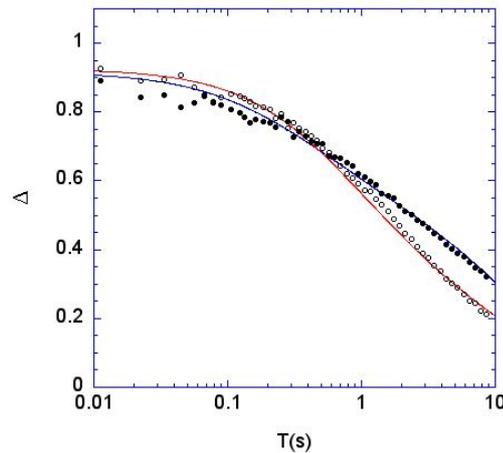


FIG. III.2.9: Ajustement des courbes de remontée de fluorescence de l'actine-GFP et de BBMI-GFP en représentation différentielle par un modèle diffusif. Les courbes continues correspondent aux courbes théoriques pour $D = 1,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ avec une fraction mobile de 90 % et $D = 3,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ avec une fraction mobile de 58 % (● : actine-GFP, ○ : BBMI-GFP).

Nous pouvons donc considérer que le mouvement observé correspond à l'actine-GFP monomérique diffusant librement et non à l'actine filamenteuse. En effet, en 10 s, nous ne nous attendons pas à observer le phénomène de tapis roulant, dont la vitesse stationnaire attendue est d'environ $0,05 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ *in vitro* [Borisy and Svitkina, 2000]. Cela expliquerait aussi la faible fraction mobile, que l'on peut interpréter en considérant que la fraction immobile correspond à l'actine-F qui n'a pas encore retrouvé sa fluorescence.

III.2.3 Effet d'un agent stabilisateur de l'actine sur la mobilité des protéines

Afin de savoir si BBMI-GFP interagissait avec l'actine, nous avons traité les cellules Caco-2 avec de la jasplakinolide, qui stabilise les filaments d'actine et «recrute» les monomères pour former de nouveaux points de nucléation, conduisant à une diminution de la concentration en actine-G.

La jasplakinolide est une molécule extraite de l'éponge marine *Jaspis johnstoni* qui a un effet analogue à la phalloïdine sur les filaments d'actine et entre en compétition avec cette dernière pour la liaison aux filaments [Bubb et al., 2000].

III.2.3.1 Effet sur l'actine-GFP

Nous avons d'abord fait une série d'acquisitions sur les cellules exprimant l'actine-GFP. Pour cela, nous avons incubé les cellules dans du milieu de culture avec $3,5 \mu\text{M}$ de jasplakinolide pendant 10 minutes, puis nous avons fait des acquisitions pendant 20 minutes. La courbe moyenne résultant de ces acquisitions est comparée à celle de l'actine-GFP dans les cellules non traitées sur la figure III.2.10.

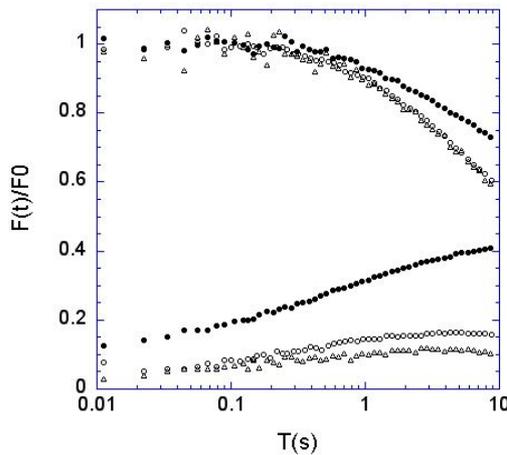


FIG. III.2.10: Effet du traitement par la jasplakinolide sur la dynamique de l'actine-GFP. ● : courbe de remontée de fluorescence de l'actine-GFP, ○ : courbe de remontée de l'actine-GFP après traitement (69 acquisitions), Δ : courbe de remontée de l'actine-GFP sur cellules fixées.

La courbe après traitement à la jasplakinolide est de très faible amplitude. De plus, si l'on compare cette courbe à celle de l'actine-GFP dans les cellules fixées, on voit que ce mouvement résiduel après traitement n'est pas significatif.

Il apparaît donc que la jasplakinolide induit une immobilisation totale et/ou un recrutement massif de l'actine-GFP. Cela est en accord avec l'hypothèse que nous n'observons que le mouvement de l'actine monomérique, qui est recrutée par la jasplakinolide.

III.2.3.2 Effet sur BBMI-GFP et BBMI Δ 730-GFP

Nous avons également étudié l'effet de la jasplakinolide sur le mouvement de BBMI-GFP pour mettre en évidence son interaction éventuelle avec l'actine. En effet, puisque la jasplakinolide immobilise complètement l'actine, nous pouvons imaginer que dans le cas où BBMI-GFP interagit avec cette dernière, son mouvement sera également modifié.

Nous avons donc fait une série d'acquisitions sur les cellules exprimant BBMI-GFP traitées suivant le même protocole que pour l'actine-GFP. La figure III.2.11 représente les courbes de remontée de fluorescence de BBMI-GFP avant et après traitement par la jasplakinolide.

Le comportement de BBMI-GFP après traitement est très différent de celui de l'actine-GFP.

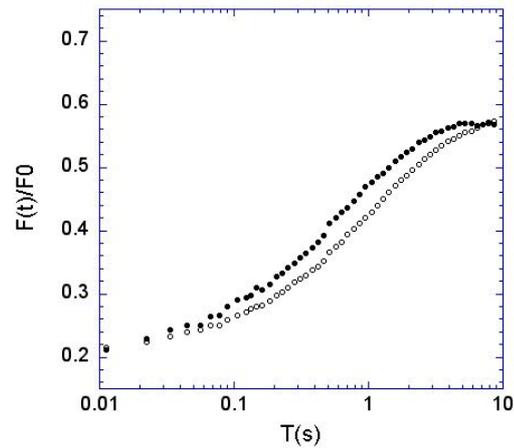


FIG. III.2.11: Effet du traitement par la jasplakinolide sur la dynamique de BBMI-GFP. (o : BBMI-GFP, ● : BBMI-GFP après traitement (94 acquisitions).)

On observe une remontée plus rapide que BBMI-GFP avant traitement, avec une «saturation» de la courbe vers 5 s et même une légère décroissance à la fin, qui correspond probablement à l'effet du photoblanchiment observationnel. Néanmoins, la fraction mobile et la profondeur de photoblanchiment sont les mêmes que pour BBMI-GFP avant traitement. Il est à noter que cette courbe ne peut pas être ajustée par le modèle diffusif utilisé pour les autres courbes. On peut simplement comparer les valeurs de $t_{1/2}$: 0,7 s avant et 0,45 s après traitement. Ces résultats indiquent une interaction entre BBMI-GFP et l'actine, ou bien un effet indirect du traitement sur le mouvement de BBMI, car nous avons fait l'hypothèse que seule l'actine monomérique est mobile à cette échelle de temps.

En effet, lorsque nous faisons les mêmes expériences sur les cellules exprimant BBMI Δ 730-GFP (qui ne possède pas de site de liaison à l'actine), nous trouvons des résultats similaires à ceux obtenus avec BBMI-GFP, comme on le voit sur la figure III.2.12.

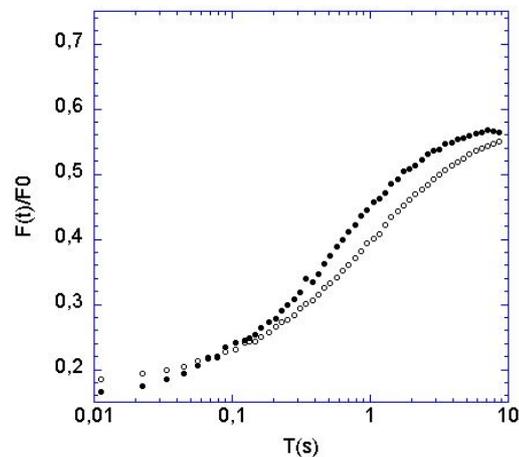


FIG. III.2.12: Effet du traitement par la jasplakinolide sur la dynamique de BBMI Δ 730-GFP. (o : avant traitement, ● : après traitement.)

On observe aussi une accélération de la remontée avec une saturation vers 6 s. Les $t_{1/2}$ sont de 0,74 s avant et 0,46 s après traitement. Il y a cependant cette fois un léger changement dans la fraction mobile (48 %) et dans la profondeur de photoblanchiment (84 %).

La similitude de l'effet de la jasplakinolide sur le mouvement de BBMI-GFP et de BBMI Δ 730-GFP semble indiquer que le traitement a un effet indirect sur ces protéines, car BBMI Δ 730-GFP ne peut pas se lier à l'actine, et se retrouve associée à la membrane plasmique lors des expériences de fractionnement de la bordure en brosse (voir plus haut).

III.2.4 Mobilité des protéines à la membrane latérale

Etant donné que les protéines étudiées sont également présentes à la membrane baso-latérale, nous nous sommes intéressés à leur dynamique dans cette région de la cellule par les mêmes méthodes que précédemment. En effet, la distribution spatiale des protéines et leurs échanges avec le cytoplasme sont différents. De plus, les interactions entre protéines sont probablement différentes. La comparaison des dynamiques dans ces deux régions de la cellule pourrait nous renseigner sur ces interactions.

III.2.4.1 BBMI-GFP

Nous avons fait une série de mesures dans la membrane latérale des cellules exprimant BBMI-GFP. Nous avons observé une différence significative entre les courbes de remontée acquises dans la membrane latérale et dans la bordure en brosse. Il y a une différence d'amplitude de la remontée et une différence de la forme même des courbes, comme on le voit sur la figure III.2.13.

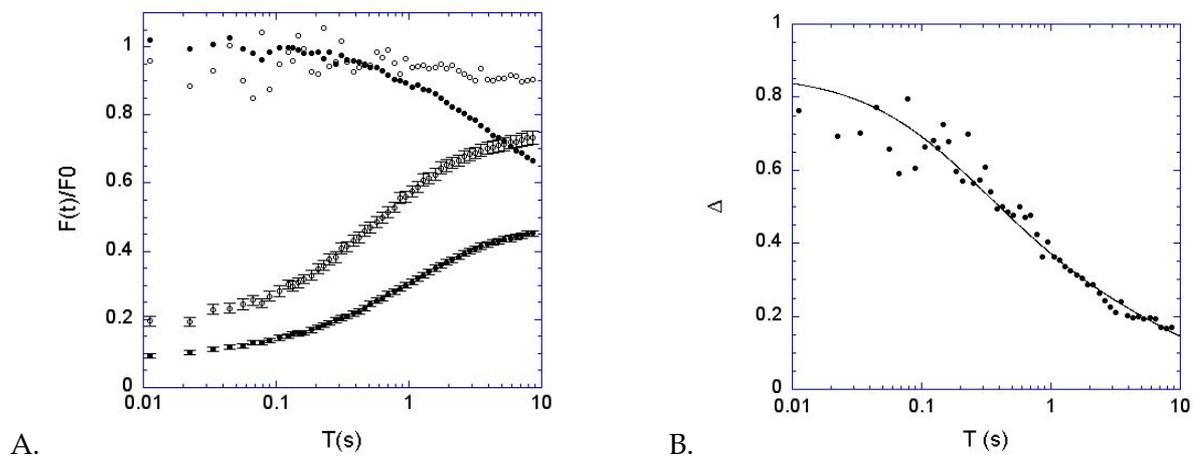


FIG. III.2.13: **Dynamique de BBMI-GFP à la membrane latérale** A : Comparaison entre la dynamique de BBMI-GFP à la membrane latérale (o, 68 acquisitions) et dans les microvillosités (●), B : ajustement théorique en représentation différentielle avec $D = 7\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 90 %.

La fraction mobile est nettement plus grande en latéral : 76 %, pour 45 ± 3 % dans la bordure en brosse. La profondeur de photoblanchiment est de 62 ± 2 % à la membrane latérale contre $78,6 \pm 0,6$ % dans la bordure en brosse. La remontée est également plus rapide en latéral, le $t_{1/2}$ est de 0,75 s dans la bordure en brosse et de 0,41 s en latéral. L'ajustement théorique de la courbe acquise à la membrane latérale donne un coefficient de diffusion $D = 7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 90 %. Il faut cependant remarquer que les mesures à la membrane latérale sont faites en 3D, et nous ne pouvons pas réduire le système à 1D comme pour les microvillosités. Les ajustements théoriques sont donc moins adaptés pour toutes ces expériences à cause de cette différence de dimensionalité. Ils permettent cependant une quantification des courbes par la même méthode que précédemment, et, donc, une meilleure comparaison des résultats obtenus entre les deux régions de la cellule.

Nous avons fait d'autres mesures en traitant les cellules avec de la jasplakinolide, pour voir si dans cette région de la cellule, elle agissait sur le mouvement de BBMI-GFP. On observe un effet assez faible, moins marqué que dans la bordure en brosse (voir figure III.2.14), montrant ici aussi une légère «accélération» de la remontée de fluorescence après traitement. Néanmoins, cet effet n'est pas très significatif dans nos conditions expérimentales et de mesure.

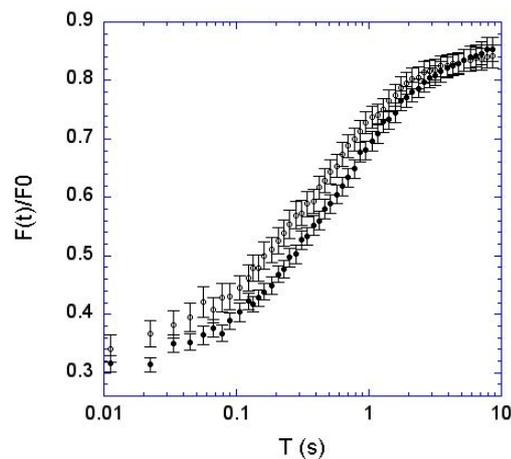


FIG. III.2.14: Effet de la jasplakinolide sur la mobilité de BBMI-GFP à la membrane latérale. (o : courbe de remontée après traitement (30 acquisitions), ● : courbe avant traitement)

III.2.4.2 BBMI Δ 730-GFP

Comme dans la bordure en brosse, nous avons voulu mettre en évidence l'activité motrice de BBMI. Nous avons donc fait une série d'acquisitions à la membrane latérale afin de mesurer la dynamique du domaine non-fonctionnel de BBMI dans cette région.

Comme pour BBMI-GFP, la fraction mobile «apparente» est nettement plus grande en latéral : 70,4 %, pour 45 % dans la bordure en brosse (voir figure III.2.15). La profondeur de photoblanchiment est également différente : 78 % en latéral contre 81,5 % dans la bordure en brosse. La remontée est également plus rapide en latéral, le $t_{1/2}$ est de 0,74 s dans la bordure en brosse

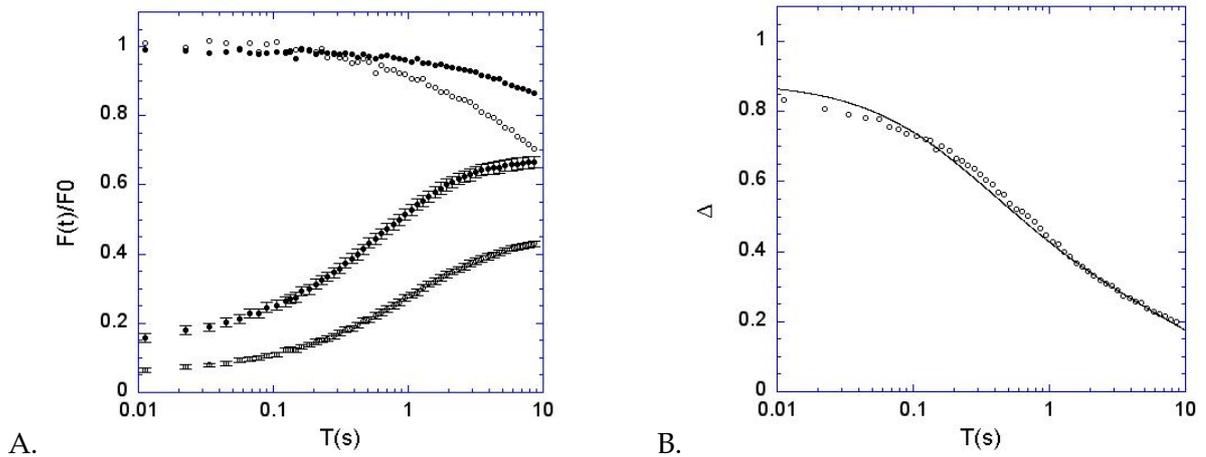


FIG. III.2.15: **Dynamique de BBMI Δ 730-GFP à la membrane latérale** A : Comparaison entre la dynamique de BBMI Δ 730-GFP à la membrane latérale (●, 131 acquisitions) et dans les microvillosités (○), B : ajustement théorique en représentation différentielle avec $D = 5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 85 %.

et de 0,46 s en latéral. Ces valeurs indiquent toutes que le mouvement est plus rapide à la membrane latérale. Ceci est confirmé par l'ajustement théorique des données qui donne un coefficient de diffusion de $5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 85 %.

Nous avons ensuite comparé les courbes de remontée de fluorescence de BBMI-GFP et de BBMI Δ 730-GFP à la membrane latérale, représentées sur la figure III.2.16.

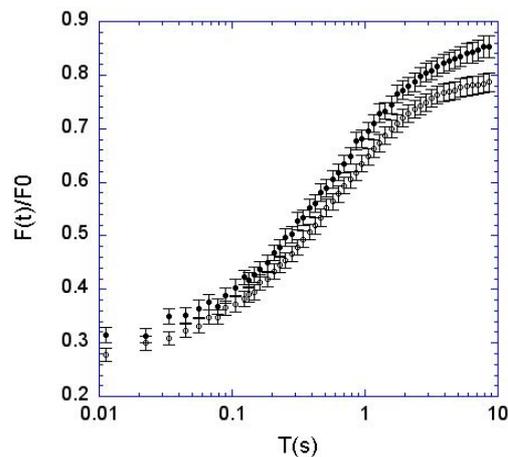


FIG. III.2.16: **Comparaison entre la dynamique de BBMI-GFP (●) et de BBMI Δ 730-GFP (○) à la membrane latérale.**

On retrouve en partie le décalage entre les deux courbes observé dans la bordure en brosse, avec une différence plus notable aux temps longs (à partir de 3 s). Néanmoins, la différence est faible et l'erreur sur la mesure plus grande à cause du plus faible nombre d'acquisitions.

La mesure de la dynamique de BBMI Δ 730-GFP à la membrane latérale après traitement des cellules par la jasplakinolide donne la courbe représentée sur la figure III.2.17 (moyenne sur 57 acquisitions).

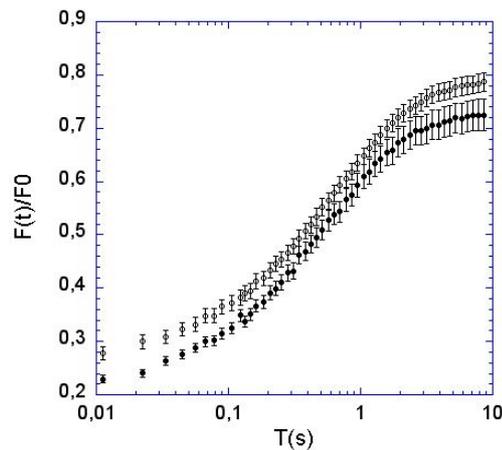


FIG. III.2.17: Effet de la jasplakinolide sur la mobilité de BBMI Δ 730-GFP à la membrane latérale. (o : courbe de remontée après traitement (57 acquisitions), \bullet : courbe de remontée avant traitement)

Les courbes de remontée avant et après traitement ont une forme proche, mais la courbe après traitement est décalée vers le haut. Elle correspond donc à une mobilité plus élevée car la profondeur de photoblanchiment est de 72 % au lieu de 78 % sans traitement. La fraction mobile est également différente : 64 % contre 70 %.

III.2.4.3 Actine-GFP

Nous avons fait une série d'acquisitions à la membrane latérale sur les cellules exprimant l'actine-GFP, dont la courbe moyenne est représentée sur la figure III.2.18.

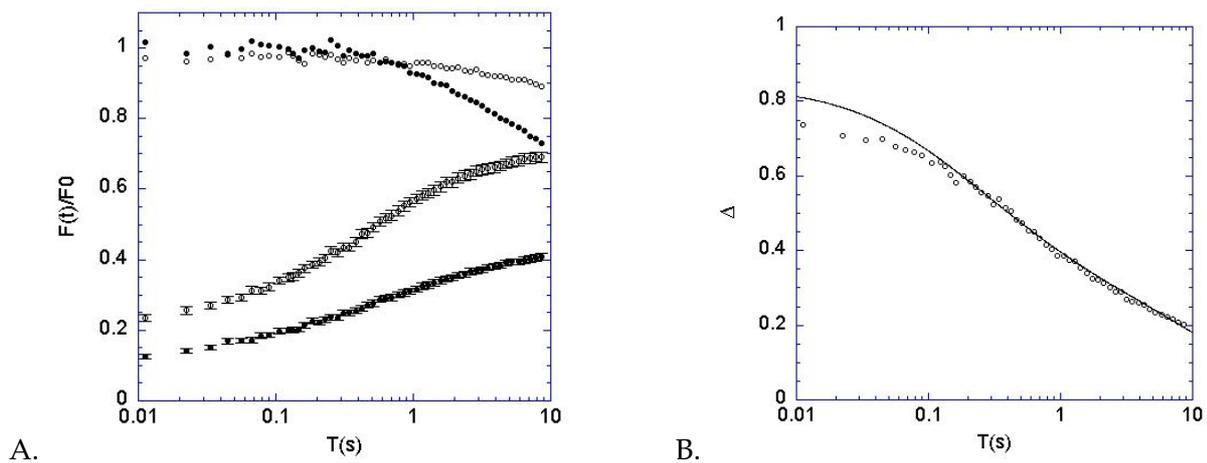


FIG. III.2.18: Dynamique de l'actine-GFP à la membrane latérale A : Comparaison entre la dynamique de l'actine-GFP à la membrane latérale (o, 150 acquisitions) et dans les microvillosités (\bullet), B : ajustement théorique en représentation différentielle avec $D = 12 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 80 %.

La fraction mobile apparente est plus grande en latéral : 71,2 %, pour 37,6 % dans la bordure en brosse. La profondeur de photoblanchiment est plus faible (65 %), indiquant une mobilité

accrue. Le $t_{1/2}$ est d'environ 0,44 s dans la bordure en brosse et de 0,40 s en latéral. L'ajustement théorique donne les valeurs $D = 12\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 80 %, confirmant les observations directes.

Nous avons fait d'autres acquisitions en traitant les cellules avec de la jasplakinolide, pour voir si dans cette région de la cellule, on observait la même réduction de mobilité que dans la bordure en brosse. La figure III.2.19 représente la courbe de remontée de l'actine-GFP avant et après traitement par la jasplakinolide.

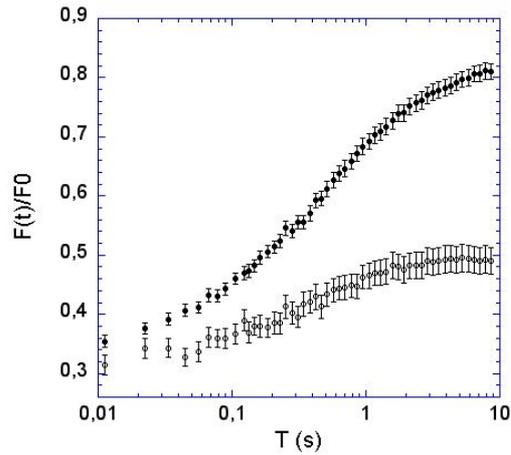


FIG. III.2.19: Effet de la jasplakinolide sur la mobilité de l'actine-GFP à la membrane latérale. (o : courbe de remontée après traitement (37 acquisitions), ● : courbe avant traitement)

Nous pouvons constater que la jasplakinolide a également un effet sur le mouvement de l'actine-GFP à la membrane latérale. Comme dans la bordure en brosse, il y a une légère décroissance de la courbe à partir de 5 s, que l'on peut attribuer au photoblanchiment à la puissance d'observation. L'effet de la jasplakinolide est très similaire à celui dans la bordure en brosse, bien que moins marqué, probablement à cause de la différence de géométrie.

Quatrième partie

Discussion

Aspect physique

Ce travail de thèse démontre l'utilisation de la FRAP à deux photon pour l'étude de la dynamique des protéines dans les cellules vivantes. Contrairement aux techniques habituellement utilisées pour ce type d'étude, celle-ci permet de mesurer localement la mobilité des molécules, dans un volume de l'ordre du μm^3 , grâce aux propriétés de l'excitation à deux photons. Cela permet de «sonder» la mobilité des protéines dans toute la cellule et d'obtenir ainsi une «carte» des coefficients de diffusion de la protéine dans l'ensemble de la cellule, ou simplement d'accéder à cette mesure dans des régions subcellulaires très petites.

Nous avons également démontré dans cette étude la faisabilité d'expériences de FRAP ponctuelles sans répétition (*one-shot FRAP*), ce qui s'avère nécessaire pour de nombreuses études *in vivo*. Dans notre cas, les mesures sont limitées par les mouvements incessants des microvillosités qui entrent et sortent du volume d'excitation dans un temps relativement bref. Nous avons donc dû nous limiter à une acquisition à la fois d'une durée maximale de 10 s, la répétition d'acquisitions en un même point n'étant pas envisageable. De fait, si l'on accepte d'abandonner les hypothèses habituelles, on peut mesurer la mobilité de protéines en faisant des séries d'acquisitions uniques au lieu de répétitions d'acquisitions. Ces dernières ont pour inconvénient de masquer la fraction mobile et d'imposer l'utilisation d'un échantillon immobile globalement (c'est-à-dire sans variations de concentration des molécules fluorescentes autres que celles produites par la phase de photoblanchiment) pendant l'ensemble des répétitions et un remplissage assez rapide du profil de concentration entre chaque acquisition. En pratique, ceci n'est applicable que pour des molécules en solution, libres de bouger. La technique du «one-shot FRAP» ouvre donc un large champ d'applications pour les mesures de mobilité dans les cellules vivantes.

Il faut noter qu'il est possible de limiter l'effet du photoblanchiment observationnel en améliorant l'efficacité de la détection de la fluorescence (par l'utilisation d'une détection proximale, par exemple), ce qui permet de diminuer la puissance du laser pendant la phase d'observation. On peut également diminuer un peu la durée de la phase de photoblanchiment pourvu que la profondeur de photoblanchiment reste suffisante. La durée doit être optimisée en fonction du fluorophore utilisé, de la puissance du laser pendant la phase de photoblanchiment et de la mobilité des protéines étudiées. Ces améliorations permettront de réduire les erreurs faites lors de l'interprétation des données.

En effet, cette technique de FRAP implique l'utilisation d'outils d'analyse adéquats pour tenir compte de l'effet de la durée de la phase de photoblanchiment et du photoblanchiment observationnel. Ici, nous avons utilisé une modélisation simple par diffusion sur un axe unidimensionnel en résolvant numériquement l'équation d'évolution du système. Ce modèle nous a permis de bien décrire les courbes expérimentales et, par conséquent, d'en extraire les valeurs des paramètres fondamentaux (coefficient de diffusion et fraction mobile). On peut imaginer des modèles plus complexes d'un point de vue géométrique ou dynamique. Par exemple, au

lieu de voir une microvillosité comme un axe, on pourrait la décrire comme un objet tridimensionnel avec des contraintes géométriques correspondant à la présence du faisceau de filaments d'actine au centre de la structure. Le mouvement des protéines pourrait ne plus être purement diffusif, mais également convectif, ou tenir compte d'un flux d'échange entre deux compartiments cellulaires. On pourrait encore considérer deux populations avec des dynamiques différentes. De plus, on a vu que le photoblanchiment n'était pas modélisé correctement. On peut espérer améliorer sa description et obtenir des courbes de remontée de fluorescence théoriques plus proches des courbes expérimentales.

Enfin, la méthode de simulation utilisée peut ne pas posséder la souplesse nécessaire pour modéliser certains aspects du modèle (comme le photoblanchiment) et il est envisageable d'utiliser d'autres techniques de calcul comme la dynamique moléculaire. Cette dernière méthode permet d'imposer des contraintes sur chaque molécule directement ce qui n'est pas possible en résolvant l'équation aux dérivées partielles. Elle est cependant beaucoup plus «gourmande» en ressources informatiques et fournit des courbes plus bruitées que la résolution numérique des équations.

Aspect biologique

Il faut remarquer que notre travail est le premier à utiliser la FRAP à deux photons pour étudier un problème biologique, la seule étude publiée à ce jour étant une démonstration de faisabilité de la technique et une vérification de la validité des mesures faites avec ce nouveau type d'instrument.

Dans cette thèse, nous avons appliqué la technique de FRAP à deux photons à l'étude de la dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des cellules Caco-2. En particulier, nous nous sommes intéressés à la mobilité de BBMI et de l'actine.

Nos expériences montrent que BBMI-GFP et l'actine-GFP ont un mouvement dans les microvillosités de la bordure en brosse des cellules Caco-2. Ce mouvement est différent pour chaque protéine, BBMI-GFP est plus lente mais possède une fraction mobile supérieure.

BBMI-GFP a un mouvement dépendant de la concentration intracellulaire en ATP, contrairement à l'actine (à cette échelle de temps en tout cas) et au domaine non-fonctionnel de BBMI, BBMI Δ 730-GFP. Cette dépendance a été étudiée à l'aide de deux techniques différentes. La première consistait à diminuer la concentration d'ATP dans la cellule et à mesurer le mouvement des protéines dans ces conditions. La seconde utilisait un inhibiteur de l'activité ATPase des myosines, le BDM, pour comparer la mobilité de BBMI-GFP avec et sans activité motrice. Cette dernière technique nous a permis de mettre en évidence la composante «active» du mouvement de BBMI-GFP par comparaison avec la mobilité de BBMI Δ 730-GFP. En effet, la mobilité de BBMI-GFP après traitement au BDM correspond parfaitement à la mobilité de BBMI Δ 730-GFP sans traitement, cette dernière ne possédant pas le domaine moteur de BBMI et donc pas

le site d'hydrolyse de l'ATP.

L'interaction entre BBMI-GFP et l'actine-GFP a été étudiée en immobilisant presque totalement l'actine-GFP par traitement à la jasplakinolide. On observe alors une mobilité plus grande de BBMI-GFP et de BBMI Δ 730-GFP après traitement, que nous interprétons comme une interaction indirecte entre l'actine-GFP et ces protéines car BBMI Δ 730-GFP ne peut pas se lier à l'actine. Cette absence apparente d'interaction directe entre l'actine et BBMI peut s'expliquer par le fait que l'actine-GFP mobile à cette échelle de temps correspond aux monomères libres et non aux monomères incorporés dans les filaments d'actine. L'interaction de BBMI-GFP avec l'actine-F n'est donc pas mesurable par cette méthode pour des temps de mesure de 10 s seulement.

A la membrane latérale, la dynamique des protéines est différente. BBMI-GFP et l'actine-GFP ont une mobilité et une fraction mobile apparente plus grandes. Néanmoins, la valeur plus élevée de cette dernière est probablement due à la plus grande mobilité des protéines qui implique que la courbe de remontée de fluorescence est plus proche de son asymptote dans ce cas et atteint donc une valeur plus grande au bout de 10 s. L'ajustement des courbes semble confirmer cette observation car on obtient une fraction mobile similaire entre la bordure en brosse et la membrane latérale.

On retrouve une différence entre BBMI-GFP et BBMI Δ 730-GFP similaire à celle mesurée dans la bordure en brosse, indiquant qu'une composante du mouvement de BBMI-GFP est due à son activité ATPase dans cette région de la cellule également.

Le traitement à la jasplakinolide induit un changement de mobilité un peu différent de celui observé dans la bordure en brosse, mais moins marqué. L'effet sur BBMI Δ 730-GFP semble assez différent avec un décalage vers le haut de la courbe après traitement. Cependant, le manque d'expériences complémentaires ne permet pas de conclure sur l'interaction entre BBMI-GFP et l'actine à la membrane latérale.

La dynamique des protéines est donc différente dans les deux régions, d'un point de vue de la vitesse de diffusion. Cela pourrait s'expliquer par la différence de géométrie entre les deux régions (système plutôt bidimensionnel dans la membrane latérale et unidimensionnel dans la microvillosité) et un confinement moindre des protéines à la membrane latérale. On peut imaginer également une orientation du mouvement différente dans les deux cas car l'organisation des filaments d'actine n'est pas la même dans les microvillosités et à la membrane latérale.

Concernant l'activité de BBMI, les expériences avec le BDM et BBMI Δ 730-GFP suggèrent que le mouvement de BBMI comporte deux composantes, l'une purement diffusive (elle diffuse accrochée à la membrane plasmique comme BBMI Δ 730-GFP), l'autre due à l'activité ATPase. La conservation de la forme entre la composante diffusive et le mouvement total de BBMI suggère que l'activité ATPase a un effet global sur le mouvement et non sur une échelle de temps particulière (écart entre les courbes BBMI et BBMI Δ 730-GFP constant sur les 10 s).

En conclusion, le principal résultat que l'on peut tirer de cette étude est que BBMI a un

mouvement actif dans les microvillosités des cellules Caco-2, mais que la composante du mouvement due à son activité ATPase est faible. Ceci est compatible avec ce que l'on sait sur son activité *in vitro*. En effet, cette myosine a une vitesse très lente comparée à la myosine II ($0,08 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) et n'est pas processive. Nous avons donc décrit ce mouvement par un modèle diffusif avec $D = 1,2 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ et une fraction mobile de 90 %.

On peut donc envisager quel rôle pourrait avoir BBMI dans les microvillosités sachant qu'elle est mobile et a une activité ATPase. Au niveau de la cellule, les résultats de Durrbach et coll. suggèrent que BBMI intervient dans la transcytose de molécules internalisées au pôle basolatéral vers le pôle apical. Dans la bordure en brosse, d'après nos expériences, BBMI Δ 730-GFP a un mouvement plus lent que BBMI et la différence de mobilité semble due à l'activité ATPase de BBMI. Cela signifie que l'activité ATPase augmenterait la mobilité de la protéine. Quel est donc le rôle de BBMI dans les microvillosités ?

Des expériences faites avec les myosines I de l'amibe *Dictyostelium* montrent qu'elles interviennent dans la régulation de la tension corticale [Dai et al., 1999b]. De plus, Raucher et Sheetz ont montré que l'extension de lamellipodes dans des cellules de souris (NIH 3T3) est régulée par la tension membranaire. Quand la tension diminue, la vitesse d'extension des lamellipodes augmente, et inversement [Raucher and Sheetz, 2000]. Nous proposons donc que BBMI puisse jouer un rôle dans la régulation de la longueur des microvillosités en agissant sur la tension de la membrane plasmique.

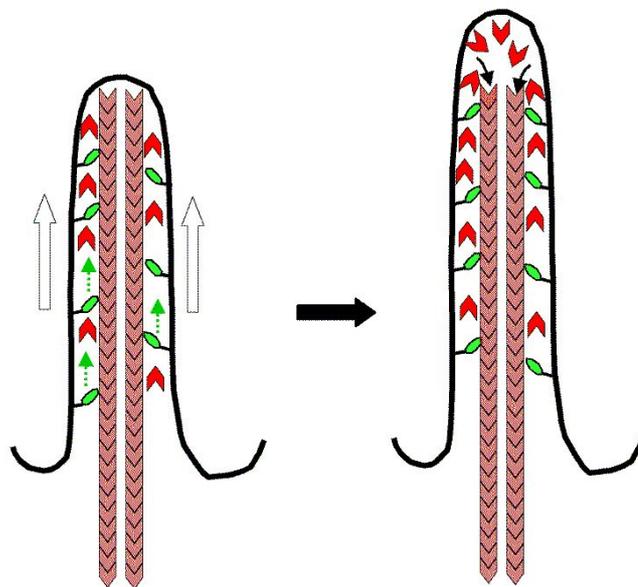


FIG. 20: Schéma explicatif de l'hypothèse du rôle de BBMI dans les microvillosités.

En effet, par son interaction avec la membrane, éventuellement via un complexe protéique, BBMI pourrait exercer une force «tirant» la membrane vers l'extrémité de la microvillosité, et ainsi diminuer la tension membranaire à l'extrémité. Ceci pourrait faciliter l'incorporation de nouveaux monomères d'actine (par diminution de la résistance exercée par la membrane),

conduisant à l'élongation de la microvillosité suite à la polymérisation de l'actine (voir figure 20), selon un mécanisme un peu similaire à celui décrit dans [Raucher and Sheetz, 2000].

Une étude vient d'être publiée sur la dynamique de BBMI dans des cellules vivantes. Tyska et Mooseker ont ainsi mesuré le taux de renouvellement de BBMI-GFP et de l'actine-GFP dans la bordure en brosse de cellules LLCPK1-CL4 (provenant du tubule proximal du rein) par FRAP en microscopie confocale, en mode XYT [Tyska and Mooseker, 2002]. Leurs expériences montrent une dynamique similaire entre BBMI-GFP et une forme tronquée de BBMI, appelée Tail-GFP (équivalente à BBMI Δ 730-GFP), avec une remontée d'environ 80 % au bout de 80 s. Cette similitude de comportement entre ces deux protéines est en contradiction avec nos résultats. Toutefois, la remontée de fluorescence de BBMI-GFP est très sensible à la diminution de concentration de l'ATP intracellulaire, comme dans notre cas. La mobilité de l'actine-GFP est nettement plus lente et réduite (environ 30 % de remontée au bout de 80 s). Contrairement à nos expériences, les auteurs n'ont pas mis en évidence une activité motrice de BBMI dans les microvillosités. De plus, ils proposent un modèle d'interprétation de leurs résultats plus complexe comprenant trois populations différentes de protéines BBMI-GFP et deux populations de protéines d'actine-GFP. Les auteurs ont cependant fait une observation morphologique intéressante pour valider notre modèle. En effet, la hauteur de la bordure en brosse apparaît plus grande et de taille irrégulière dans les cellules exprimant Tail-GFP. Ceci pourrait s'expliquer par un effet dominant négatif sur une éventuelle myosine I présente dans les microvillosités, dont le rôle serait de réguler la longueur de celles-ci, comme celui que nous proposons pour BBMI.

Leurs expériences ne sont cependant pas directement comparables aux nôtres, mais plutôt complémentaires. En effet, leur technique de mesure (FRAP en microscopie confocale), nous l'avons vu, ne permet pas une mesure locale de la mobilité contrairement à nos expériences, et les mesures sont faites sur des temps plus longs (80 s) avec une résolution temporelle nettement moins bonne (3 s contre 11 ms dans notre cas). L'analyse des données est également beaucoup plus simple car l'ajustement des courbes a été fait par une simple ou une double exponentielle, sans justification physique, ce qui a conduit les auteurs à distinguer plusieurs phases dans le mouvement des protéines (interprétées comme des populations différentes), de façon un peu artificielle. D'un point de vue biologique, les cellules utilisées sont très différentes des cellules Caco-2. Leurs microvillosités sont plus longues et la présence de BBMI n'est pas prouvée, malgré la présence possible d'une myosine I détectée par réplique immunologique. La distribution des protéines dans les cellules LLCPK1-CL4 correspondrait à celle dans des cellules intestinales partiellement différenciées (contrairement aux Caco-2), ce qui peut fausser les résultats concernant la dynamique de BBMI et de l'actine. Leurs conditions de mesures sont donc loin des conditions rencontrées dans les entérocytes.

Perspectives

Plusieurs voies de recherche restent à explorer pour compléter notre connaissance du rôle de BBMI dans la bordure en brosse et, plus généralement, de la dynamique de cette région.

Tout d'abord, afin de tester notre modèle d'interprétation du rôle de BBMI, il serait intéressant de mesurer la dynamique des protéines étudiées dans ce travail dans des conditions qui entraînent l'élongation des microvillosités (en modifiant la concentration en Ca^{2+} , par exemple). Nous pouvons alors nous attendre à une activité accrue de BBMI ainsi qu'une mobilité plus grande de l'actine. BBMI Δ 730 ne devrait pas, en revanche, avoir une dynamique différente. Une étude un peu complémentaire pourrait être faite en comparant la dynamique dans des cellules à différents stades de différenciation.

Afin de mieux caractériser la composante active du mouvement de BBMI, il serait intéressant de faire des expériences de FRAP avec un mutant de BBMI privé de son activité ATPase mais conservant l'intégrité du reste de sa structure, notamment du site de liaison à l'actine. Le mouvement de cette protéine correspondrait exactement à la composante passive du mouvement de BBMI.

Avec le développement en cours dans notre équipe d'un nouveau microscope combinant la FRAP à deux photons et l'imagerie 4D rapide, il sera bientôt envisageable d'étudier la directionnalité du mouvement de BBMI, mesure inaccessible avec notre instrument. Cette information est importante pour confirmer la nature du mouvement de BBMI et préciser son rôle dans les microvillosités.

BBMI interagissant avec les lipides *in vitro*, on peut légitimement se demander s'il existe une interaction entre cette protéine et la membrane lipidique dans les microvillosités des cellules vivantes. En étudiant la dynamique des lipides de la membrane plasmique et en la comparant à celle de BBMI, on pourrait déceler une éventuelle corrélation due à cette interaction. Au lieu de marquer les lipides, on peut aussi envisager de marquer une protéine membranaire comme DPPIV par fusion avec un autre mutant de la GFP (dont le pic d'émission est bien distinct de celui de la EGFP pour séparer la fluorescence provenant des deux protéines) et faire des expériences de FRAP en simultané sur cette protéine membranaire et sur BBMI-EGFP. Ce type d'expérience, dites de co-FRAP, c'est-à-dire de FRAP sur deux marqueurs en simultané, est tout-à-fait envisageable sur notre instrument. Il suffit d'utiliser le deuxième photomultiplicateur avec un filtre de fluorescence adapté. Il est à noter que ceci n'a jamais été réalisé en FRAP à deux photons et constitue une application particulièrement intéressante et nouvelle de cette technique.

En plus de ce rôle de maintien et de régulation de la structure des microvillosités, BBMI pourrait intervenir dans les phénomènes de transports siègeant dans cette région de la cellule. En particulier, il serait intéressant d'étudier son rôle dans l'endocytose et l'exocytose. En effet, une hypothèse courante est que BBMI transporte des vésicules du bas du plateau terminal

vers les microvillosités lors de la transcytose par exemple. On peut également imaginer qu'elle puisse transporter ou réguler le transport des nutriments internalisés au niveau de la bordure en brosse vers les compartiments d'endocytose. Il suffirait de pouvoir marquer sélectivement ces vésicules (en mettant un marqueur au pôle basolatéral ou au pôle apical) et faire une étude dynamique de la colocalisation entre ces vésicules et BBMI-GFP par co-FRAP.

A un niveau plus global, nous avons également commencé une étude des échanges de BBMI entre les deux pôles de la cellule et au sein de la bordure en brosse. Ces expériences utilisent une technique différente des expériences présentées ici. En effet, nous avons utilisé non plus le mode ponctuel mais le mode XYT pour l'acquisition des données. Ce mode, déjà décrit dans la partie II, consiste à faire une série temporelle d'images dans un plan, à photoblanchir une bande de largeur variable dans la bordure en brosse le temps d'une image, puis à observer le retour de fluorescence pendant le restant de la série. La figure 21 montre un exemple d'une telle série où l'on peut voir la récupération de la fluorescence dans la région photoblanchie. On peut

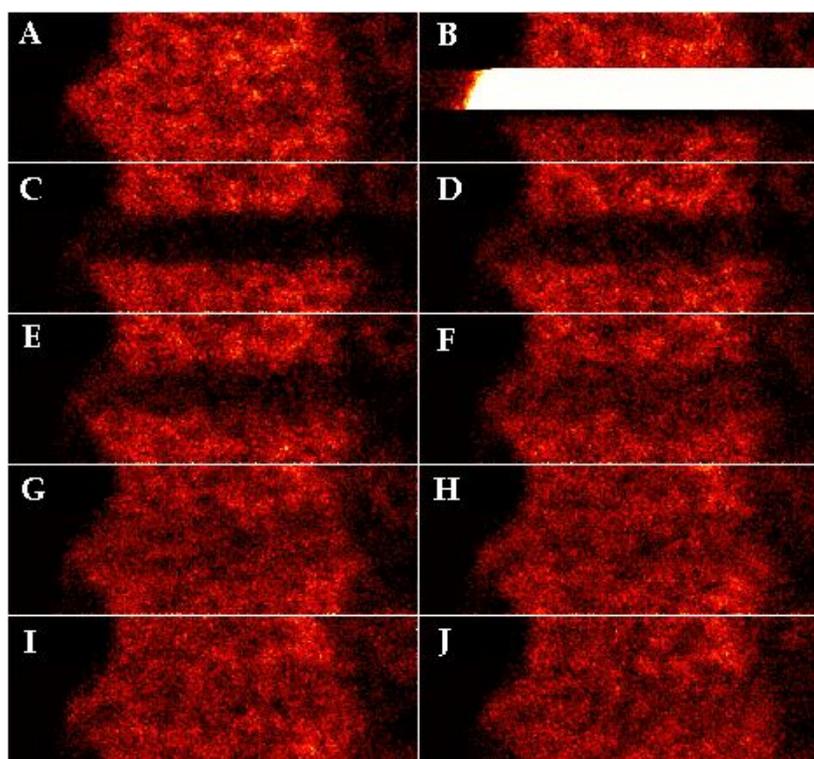


FIG. 21: **Série temporelle d'images de la bordure en brosse des cellules Caco-2.** A : image avant le photoblanchiment, B : photoblanchiment d'une région de la bordure en brosse, C à J : phase de remontée de la fluorescence. En C, on remarque la région photoblanchie.

ensuite analyser la fluorescence au cours du temps dans différentes régions de l'image ou faire un profil («une coupe») de la zone photoblanchie en fonction du temps. On peut également étudier la variation du temps de remontée en fonction de la position de la région analysée ou encore l'effet de la largeur de la bande photoblanchie. Par cette méthode, nous avons déjà observé une variation des courbes de remontée de fluorescence en fonction de la largeur de la bande photoblanchie. Nous avons aussi observé le renouvellement de BBMI-GFP dans la

bordure en brosse. Il nous faut cependant compléter ces expériences pour pouvoir confirmer nos observations et mieux caractériser la dynamique de BBMI à cette échelle de temps. Si, maintenant, on photoblanchit une région de la membrane latérale, on pourrait voir si cela a une influence sur la fluorescence de la bordure en brosse, autrement dit, si les protéines présentes à la membrane latérale s'échangent avec la bordure en brosse ou non, et si oui, à quelle vitesse.

Pour aller encore plus loin dans l'étude fonctionnelle de BBMI, on peut envisager des expériences chez l'animal en utilisant des souris transgéniques exprimant BBMI-GFP ou l'actine-GFP par exemple, cette technique étant disponible à l'Institut Curie. Le marquage pourrait également être fait par d'autres techniques, comme la transfection directe par transport de peptides. L'utilisation de souris présentant des dysfonctionnements bien déterminés de l'intestin, par exemple un défaut d'absorption de certains nutriments, permettrait de préciser le rôle de BBMI et de l'actine dans la dynamique de la bordure en brosse en comparant leur dynamique avec celle mesurée chez des animaux sains. Cela pourrait éventuellement améliorer notre connaissance de certaines pathologies et nous permettre d'envisager une thérapie adaptée.

Enfin, la technique développée lors de cette thèse peut trouver d'autres applications que celle présentée dans ce mémoire et permettre d'accéder à une vision dynamique des assemblages et interactions moléculaires présents dans les cellules vivantes, avec une résolution tridimensionnelle des mesures, et de mieux comprendre les processus qui gouvernent le fonctionnement des cellules.

Bibliographie

- [Alberts et al., 1995] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (1995). *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-Science Flammarion.
- [Amos and Amos, 1991] Amos, L. and Amos, W. (1991). *Molecules of the cytoskeleton*. MacMillan.
- [André et al., 1999] André, J.-M., Catala, M., Escudier, E., Kujas, M., Morère, J.-J., and Poirier, J. (1999). *Histologie moléculaire - Texte et atlas*. Masson.
- [Arpin et al., 1999] Arpin, M., Crepaldi, T., and Louvard, D. (1999). *Cross-talk between apical and basolateral domains of epithelial cells regulates microvillus assembly*, pages 95–116. Harwood Academic Press.
- [Arpin and Friederich, 1992] Arpin, M. and Friederich, E. (1992). *Cytoskeletal components in intestinal brush border morphogenesis : an evaluation of their function*, chapter 9, pages 245–271. Chapman and Hall.
- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16 :1055–1069.
- [Baker and Titus, 1998] Baker, J. and Titus, M. (1998). Myosins : matching functions with motors. *Current Opinion in Cell Biology*, 10 :80–86.
- [Bement and Mooseker, 1995] Bement, W. and Mooseker, M. (1995). TEDS rule : a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 31 :87–92.
- [Berg et al., 2001] Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E. (2001). A Millennial Myosin Census. *Molecular Biology of the Cell*, 12 :780–794.
- [Berland et al., 1995] Berland, K., So, P., and Gratton, E. (1995). Two-photon fluorescence correlation spectroscopy : method and application to the intracellular environment. *Biophysical Journal*, 68 :694–701.
- [Bikle et al., 1996] Bikle, D., Munson, S., and Komuves, L. (1996). Zipper protein, a B-G protein with the ability to regulate actin/myosin I interactions in the intestinal brush border. *Journal of Biological Chemistry*, 271(15) :9075–9083.
- [Borisy and Svitkina, 2000] Borisy, G. and Svitkina, T. (2000). Actin machinery : Pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 :104–112.

- [Bretscher, 1991] Bretscher, A. (1991). Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 7 :337–374.
- [Brown et al., 1999] Brown, E., Wu, E., Zipfel, W., and Webb, W. (1999). Measurement of molecular diffusion in solution by multiphoton fluorescence photobleaching recovery. *Biophysical Journal*, 77 :2837–2849.
- [Brzeska and Korn, 1996] Brzeska, H. and Korn, E. (1996). Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29) :16983–16986.
- [Bubb et al., 2000] Bubb, M., Spector, I., Beyer, B., and Fosen, K. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. *J Biol Chem*, 275 :5163–5170.
- [Collins and Swanljung-Collins, 1992] Collins, J. and Swanljung-Collins, H. (1992). *Calcium regulation of myosin I - a motor for membrane movement*, pages 159–163. Plenum Press.
- [Collins et al., 1990] Collins, K., Sellers, J., and Matsudaira, P. (1990). Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I (110-kD-calmodulin) mechanochemical activity in vitro. *Journal of Cell Biology*, 110(4) :1137–1147.
- [Coudrier et al., 1988] Coudrier, E., Kerjaschki, D., and Louvard, D. (1988). Cytoskeleton organisation and submembranous interactions in intestinal and renal brush borders. *Kidney International*, 34 :309–320.
- [Coudrier et al., 1983] Coudrier, E., Reggio, H., and Louvard, D. (1983). Characterisation of an integral membrane glycoprotein associated with the microfilaments of pig intestinal microvilli. *The EMBO Journal*, 2(3) :469–475.
- [Dai et al., 1999a] Dai, J., Ting-Beall, H., Hochmuth, R., Scheetz, M., and Titus, M. (1999a). Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophysical journal*, 77 :1168–1176.
- [Dai et al., 1999b] Dai, J., Ting-Beall, H., Hochmuth, R., Scheetz, M., and Titus, M. (1999b). Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophysical Journal*, 77 :1168–1176.
- [Demas and Crosby, 1971] Demas, J. and Crosby, G. (1971). The measurement of photoluminescence quantum yields. *J. Phys. Chem.*, 75 :991–1024.
- [Denk et al., 1990] Denk, W., Strickler, J., and Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248 :73–76.
- [Drenckhahn and Dermietzel, 1988] Drenckhahn, D. and Dermietzel, R. (1988). Organisation of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border : a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *Journal of Cell Biology*, 107 :1037–1048.
- [Durrbach et al., 1996] Durrbach, A., Collins, K., Matsudaira, P., Louvard, D., and Coudrier, E. (1996). Brush border myosin-I truncated in the motor domain impairs the distribution and the function of endocytotic compartments in an hepatoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 93 :705–7058.

- [Durrbach et al., 2000] Durrbach, A., Raposo, G., Tenza, D., Louvard, D., and Coudrier, E. (2000). Truncated brush border myosin-I affects membrane traffic in polarized epithelial cells. *Traffic*, 1 :411–424.
- [Fanning et al., 1994] Fanning, A., Wolenski, J., Mooseker, M., and Izant, J. (1994). Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanochemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 29 :29–45.
- [Fath et al., 1994] Fath, K., Trimbur, G., and Burgess, D. (1994). Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 126 :117–127.
- [Fricke, 2000] Fricke, M. (2000). *Parallel-Processing in der Zwei-Photonen-Laser-Raster-Mikroskopie*. PhD thesis, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik.
- [Gillespie et al., 2001] Gillespie, P. G., Albanesi, J. P., Bahler, M., Bement, W. M., Berg, J. S., Burgess, D. R., Burnside, B., Cheney, R. E., Corey, D. P., Coudrier, E., de Lanerolle, P., Hammer, J. A., Hasson, T., Holt, J. R., Hudspeth, A. J., Ikebe, M., Kendrick-Jones, J., Korn, E. D., Li, R., Mercer, J. A., Milligan, R. A., Mooseker, M. S., Ostap, E. M., Petit, C., Pollard, T. D., Sellers, J. R., Soldati, T., and Titus, M. A. (2001). Myosin-I nomenclature. *Journal of Cell Biology*, 155(5) :703–704.
- [Göppert-Mayer, 1931] Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 9 :273–295.
- [Hayden et al., 1990] Hayden, S., Wolenski, J., and Mooseker, M. (1990). Binding of brush border myosin I to phospholipid vesicles. *Journal of Cell Biology*, 111 :443–451.
- [Heintzelman and Mooseker, 1992] Heintzelman, M. and Mooseker, M. (1992). Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton. *Current Topics in Developmental Biology*, 26 :93–121.
- [Heintzelman et al., 1994] Heintzelman, M. B., Hasson, T., and Mooseker, M. S. (1994). Multiple unconventional myosin domains of the intestinal brush border cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 107 :3535–3543.
- [Hell et al., 1993] Hell, S., Reiner, G., Cremer, C., and Stelzer, E. (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *Journal of Microscopy*, 169 :391–402.
- [Ishijima et al., 1998] Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H., and Yanagida, T. (1998). Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell*, 92 :161–171.
- [Jackman et al., 1994] Jackman, M., Shurety, W., Ellis, J., and Luzio, J. (1994). Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in caco-2 cells by cytochalasin d. *Journal of Cell Science*, 107 :2547–2556.

- [Jacobson and Wojcieszyn, 1984] Jacobson, K. and Wojcieszyn, J. (1984). The translational mobility of substances within the cytoplasmic matrix. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 81 :6747–6751.
- [Jontes and Milligan, 1997a] Jontes, J. and Milligan, R. (1997a). Brush border myosin-I structure and ADP-dependent conformational changes revealed by cryoelectron microscopy and image analysis. *Journal of Cell Biology*, 139 :683–693.
- [Jontes and Milligan, 1997b] Jontes, J. and Milligan, R. (1997b). Three-dimensional structure of brush border myosin-i at approximately 20 Å resolution by electron microscopy and image analysis. *J. of Mol. Biol.*, 266 :331–342.
- [Jontes et al., 1997] Jontes, J., Milligan, R., Pollard, T., and Ostap, E. (1997). Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 94 :14332–14337.
- [Kaiser and Garrett, 1961] Kaiser, W. and Garrett, C. (1961). Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.*, 7 :229–231.
- [Louvard et al., 1992] Louvard, D., Kedinger, M., and Hauri, H. (1992). The differentiating intestinal epithelial cell. *Annual Review of Cell Biology*, 8 :157–195.
- [Marieb, 1999] Marieb, E. N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*. De Boeck Université.
- [Mertz, 1998] Mertz, J. (1998). Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *Eur. Phys. J. -D*, 3 :53–66.
- [Mertz et al., 1995] Mertz, J., Xu, C., and Webb, W. (1995). Single-molecule detection by two-photon excited fluorescence. *Opt. Lett.*, 20 :2532–2534.
- [Moores et al., 1996] Moores, S., Sabry, J., and Spudich, J. (1996). Myosin dynamics in live dictyostelium cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93 :443–446.
- [Mooseker and Coleman, 1989] Mooseker, M. and Coleman, T. (1989). The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus (brush border myosin I) is a mechanoenzyme. *Journal of Cell Biology*, 108 :2395–2400.
- [Mooseker et al., 1989] Mooseker, M., Conzelman, K., Coleman, T., and Heuser, J. (1989). Characterization of intestinal microvillar membrane disks : detergent-resistant membrane sheets enriched in associated brush border myosin I (110kD-calmodulin). *Journal of Cell Biology*, 109 :1153–1161.
- [Mooseker et al., 1978] Mooseker, M. S., Pollard, T. D., and Fujiwara, K. (1978). Characterization and localization of myosin in the brush border of intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 79 :444–453.
- [Nehls et al., 2000] Nehls, S., Snapp, E., Cole, N., Zaal, K., Kenworthy, A., Roberts, T., Ellenberg, J., Presley, J., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2000). Dynamic and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nature cell biology*, 2 :288–295.
- [Patterson and Piston, 2000] Patterson, G. and Piston, D. (2000). Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophysical Journal*, 78 :2159–2162.

- [Peterman et al., 1999] Peterman, E., Brasselet, S., and Moerner, W. (1999). The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein. *J. Phys. Chem. A*, 103 :10553–10560.
- [Peterson et al., 1993] Peterson, M., Bement, W., and Mooseker, M. (1993). An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. *Journal of Cell Science*, 105 :461–472.
- [Pinto et al., 1983] Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dusaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J., and Zweibaum, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol. Cell.*, 47 :323–330.
- [Piston et al., 1994] Piston, D., Kirby, M., Cheng, H., Lederer, W., and Webb, W. (1994). Two-photon excitation fluorescence imaging of three-dimensional calcium-ion activity. *Applied Optics*, 33(4) :662–669.
- [Piston et al., 1992] Piston, D., Wu, E., and Webb, W. (1992). Three dimensional diffusion measurements in cells by two-photon excitation fluorescence photobleaching recovery. *Biophysical Journal*, 61 :A34.
- [Raucher and Sheetz, 2000] Raucher, D. and Sheetz, M. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *Journal of Cell Biology*, 148 :127–136.
- [Schulthess and Hauser, 1995] Schulthess, G. and Hauser, H. (1995). A unique feature of lipid dynamics in small intestinal brush border membrane. *Molecular Membrane Biology*, 12 :105–112.
- [Shimomura et al., 1962] Shimomura, O., Johnson, F., and Saiga, Y. (1962). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59 :223–239.
- [Simons and van Meer, 1988] Simons, K. and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17) :6197–6202.
- [Skowron et al., 1998] Skowron, J., Bement, W., and Mooseker, M. S. (1998). Human brush border myosin-I and myosin-Ic expression in human intestine and Caco-2BBE cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 41 :308–324.
- [Stidwill et al., 1984] Stidwill, R., Wysolmerski, T., and Burgess, D. (1984). The brush border is not static : in vivo turnover of proteins. *The Journal of Cell Biology*, 98 :641–645.
- [Swaminathan et al., 1997] Swaminathan, R., Hoang, C., and Verkman, A. (1997). Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells : cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal*, 72 :1900–1907.
- [Swanljung-Collins and Collins, 1991] Swanljung-Collins, H. and Collins, J. (1991). Ca²⁺ stimulates the Mg²⁺-ATPase activity of brush border myosin I with three or four calmodulin light chains but inhibits with less than two bound. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2) :1312–1319.

- [Swanljung-Collins and Collins, 1992] Swanljung-Collins, H. and Collins, J. (1992). Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by Ca(2+)-stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5) :3445–3454.
- [Swanljung-Collins and Collins, 1994] Swanljung-Collins, H. and Collins, J. (1994). *Brush border myosin I has a calmodulin/phosphatidylserine switch and tail actin-binding*, pages 205–213. Plenum Press.
- [Taunton et al., 2000] Taunton, J., Rowning, B., Coughlin, M., Wu, M., Moon, R., Mitchison, T., and Larabel, C. (2000). Actin-depend propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *Journal of Cell Biology*, 148 :519–530.
- [Theriot et al., 1994] Theriot, J., Rosenblatt, J., Portnoy, D., Clermont, P., and Mitchison, T. (1994). Involvement of profilin in the actin-based motility of listeria monocytogenes in cells and cell-free extracts. *Cell*, 76 :505–517.
- [Thomson et al., 1993] Thomson, A., Schoeller, C., Keelan, M., Smith, L., and Clandinin, M. (1993). Lipid absorption : passing through the unstirred layers, brush border membrane, and beyond. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71 :531–555.
- [Tyska and Mooseker, 2002] Tyska, M. and Mooseker, M. (2002). MYO1A (Brush Border Myosin I) Dynamics in the Brush Border of LLC-PK1-CL4 Cells. *Biophysical Journal*, 82 :1869–1883.
- [Veigel et al., 1999] Veigel, C., Coluccio, L., Jontes, J., Sparrow, J., Milligan, R., and Molloy, J. (1999). The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*, 398 :530–533.
- [Wagner and Molitoris, 1997] Wagner, M. C. and Molitoris, B. A. (1997). Atp depletion alters myosin i beta cellular location in llc-pk1 cells. *Am J Physiol*, 272 :C1680–90.
- [Well et al., 1999] Well, A., Lin, A., Chen, L.-Q., Safer, D., Cain, S., Hasson, T., Carragher, B., Milligan, R., and Sweeney, H. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*, 401 :505.
- [Whittaker and Milligan, 1997] Whittaker, M. and Milligan, R. (1997). Conformational changes due to calcium-induced calmodulin dissociation in brush border myosin I-decorated F-actin revealed by cryoelectron microscopy and image analysis. *Journal of Molecular Biology*, 269 :548–557.
- [Williams et al., 1994] Williams, R., Piston, D., and Webb, W. (1994). Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry. *FASEB Journal*, 8 :804–813.
- [Willis, 1999] Willis, R. (1999). Examining live embryos nondestructively. *Biophotonics international*, nov./dec. :42–44.
- [Wolfrum et al., 1998] Wolfrum, U., Liu, X., Schmitt, A., Udovichenko, I., and Williams, D. (1998). Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 40 :261–271.

- [Xu and Webb, 1996] Xu, C. and Webb, W. (1996). Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B*, 13 :481–491.
- [Xu et al., 1996] Xu, C., Zipfel, W., Shear, J., Williams, R., and Webb, W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation : New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 93 :10763–10768.
- [Yeaman et al., 1999] Yeaman, C., Grindstaff, K., and Nelson, W. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiological Reviews*, 79 :73–98.
- [Zahraoui et al., 2000] Zahraoui, A., Louvard, D., and Galli, T. (2000). Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *Journal of Cell Biology*, 151 (5) :F31–F36.
- [Zot, 1995] Zot, H. (1995). Phospholipid membrane-associated brush border myosin-I activity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 30 :26–37.
- [Zot et al., 1992] Zot, H., Doberstein, S., and Pollard, T. (1992). Myosin-I moves actin filaments on a phospholipid substrate : implications for membrane targeting. *Journal of Cell Biology*, 116(2) :367–376.

Résumé

Les cellules épithéliales de l'intestin possèdent une membrane plasmique spécialisée, la bordure en brosse, qui est constituée de protubérances en forme de doigts appelées microvillosités. Chaque microvillosité est composée d'un faisceau de filaments d'actine et d'un réseau en hélice de molécules de myosine I de la bordure en brosse (BBMI) formant des liens entre la membrane plasmique et les filaments d'actine. Lors de l'assemblage de la bordure en brosse, il se produit des phénomènes hautement dynamiques. En particulier, le nombre et la taille des microvillosités augmentent durant la dernière étape de différenciation des entérocytes adultes, comme au cours de la phase finale de l'embryogenèse. Le renouvellement rapide des protéines membranaires et du cytosquelette dans les entérocytes matures suggère également que des processus dynamiques ont lieu pour permettre à ces cellules de conserver leur morphologie. La dynamique des microvillosités pourrait être due à la polymérisation de l'actine qui est suffisante pour assurer la propulsion des bactéries, par exemple. Alternativement, BBMI pourrait être responsable de cette dynamique, soit en générant une force comme proposé par Sheetz pour l'extension des cônes de croissance des filopodes, soit en acheminant des composants membranaires au pôle apical de la cellule. Afin d'élucider la dynamique de BBMI et de l'actine dans la bordure en brosse des entérocytes, nous avons mis au point un instrument permettant la mesure de la mobilité tridimensionnelle des protéines dans des cellules vivantes en combinant l'imagerie de cellules vivantes en microscopie à deux photons avec la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Nos résultats montrent que BBMI et l'actine sont mobiles, mais avec une dynamique différente. De plus, nous avons montré, pour la première fois dans des cellules vivantes, que BBMI a une activité motrice dans les microvillosités.

Abstract

Intestinal epithelial cells contain a brush-like membrane composed of numerous finger-like protuberances called microvilli. Each microvillus is composed of a core bundle containing actin filaments and an helical array of brush border myosin I (BBMI) cross bridges between the plasma membrane and actin filaments. Highly dynamic processes occurs during brush border assembly. In particular, the number and the length of microvilli increase during the final step of adult enterocyte differentiation, as well as during the last stage of embryogenesis. The rapid turnover of cytoskeleton and membrane proteins in the mature enterocytes also suggests that dynamic processes also take place while the enterocyte maintains a stationary morphology. Microvilli dynamics might be driven by the polymerization of actin that is sufficient for example the rocketing motion of bacteria. Alternatively, and non-exclusively, microvilli dynamics might be powered by BBMI either by generating a force as proposed by M. Sheetz during the extension of growth cones filopodia, or by delivering membrane component to the apical domain. In order to elucidate the dynamics of BBMI and actin in the enterocyte brush border, we made an instrument allowing the measurement of tridimensional mobility of proteins in live cells by combining two-photon fluorescence imaging of living cells with fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Ours results show that both actin and BBMI are mobile, but with different dynamics. Moreover, we showed for the first time in living cells that BBMI has a motor activity in microvilli.