



HAL
open science

Auto-organisation des microtubules sous l'action de champs externes faibles. Comparaisons entre expériences et simulations numériques

Nicolas Glade

► **To cite this version:**

Nicolas Glade. Auto-organisation des microtubules sous l'action de champs externes faibles. Comparaisons entre expériences et simulations numériques. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2002. Français. NNT: . tel-00005407

HAL Id: tel-00005407

<https://theses.hal.science/tel-00005407>

Submitted on 20 Mar 2004

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.

THESE

Présentée par

Nicolas GLADE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

Discipline : BIOPHYSIQUE

*Effet des champs externes faibles sur l'auto-organisation des microtubules.
Comparaisons entre expériences et simulations numériques.*

Date de soutenance: *10 décembre 2002*

Composition du jury:	<i>Président du jury</i>	Michel LAURENT
	<i>Rapporteurs</i>	Patrick DE KEPPER Michel LAURENT
	<i>Examineurs</i>	Augusto COGOLI Patrice MARCHE Pierre VIGNAIS
	<i>Directeurs</i>	James TABONY et Jacques DEMONGEOT

Thèse préparée au laboratoire d'Immunochimie,
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires
ICH - DRDC, INSERM U548 – CEA Grenoble,
et au

Laboratoire des Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition,
Institut des Mathématiques Appliquées de Grenoble
TIMC - IMAG, CNRS UMR 5525 - Faculté de Médecine de la Tronche.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier James Tabony et Jacques Demongeot, pour leur disponibilité et leurs conseils durant tout mon travail de thèse. Les nombreuses longues discussions que j'ai pu avoir avec eux ont été souvent très fructueuses. Elles ont permis de dégager et de développer un grand nombre de concepts sur la phénoménologie du processus d'auto-organisation et à la base du modèle que j'ai élaboré.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux personnes avec lesquelles j'ai travaillé. Sans elles, ce travail en aurait été fortement amoindri. Je commencerai par les deux Nathalie, dans l'ordre chronologique Nathalie Pochon puis Nathalie Rigotti, pour leur assistance technique essentielle et pour avoir partagé durant quatre années notre espace de travail en très bonne entente.

Ensuite, je dois remercier les personnes extérieures du laboratoire que j'ai rencontré lors de mes 'campagnes' expérimentales et qui m'ont donné les moyens de réaliser mes projets expérimentaux. Par ordre chronologique des expériences:

Éric Beaugnon ainsi que l'ensemble des membres du CRETA-CNRS nous ont cordialement accueillis dans son labo; Éric m'a initié à la lévitation magnétique en me donnant un accès presque illimité à 'son aimant'.

Les premières expériences faites dans des simulateurs d'apesanteur au sol se sont déroulées dans le laboratoire d'Augusto Cogoli, le 'Space Group Biology' de l'ETH de Zurich. Augusto et sa femme Marianne, ainsi qu'Isabelle Walther nous ont chaleureusement accueillis à Zurich durant une semaine et ont mis à notre disposition les simulateurs d'apesanteur, leur laboratoire et leur personne.

Bien que nos expériences n'aient pas donné de résultats encourageants, je remercie Anne Perrin de nous avoir donné l'accès aux antennes électromagnétiques du CRSSA de Grenoble.

Une autre partie des expériences en champs magnétiques intenses a été faite au LCMI du CNRS de Grenoble. Notre travail et l'obtention d'heures de champ a été facilité par Éric Mossang et Carole Toia.

Bien que je ne le connaisse pas personnellement, je remercie Jack Van Loon du laboratoire ACTA d'Amsterdam pour nous avoir gracieusement prêtés un clinostat 2D dans lequel j'ai réalisé des expériences extrêmement concluantes.

Un grand merci aussi à Isabelle Chartier du LETI au CEA Grenoble, pour nous avoir donné accès aux expériences d'auto-organisation *in vitro* à une échelle cellulaire. Elle et son équipe nous ont fournis des microcuvettes en PDMS, de dimensions cellulaires, et surtout leurs moules et la technique pour les fabriquer.

Enfin, parmi toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de la thèse, il y a une vers laquelle j'exprime ma plus profonde gratitude. Bernard Sartor du DRDC au CEA Grenoble, outre le fait d'être particulièrement sympathique, a rivalisé d'ingéniosité pour me fabriquer l'ensemble des porte-échantillons dans lesquels j'ai réalisé mes expériences. Il n'est d'ailleurs jamais à cours d'idées quel que soit le problème technique rencontré et m'a sorti plus d'une fois d'affaire en restant toujours très disponible pour moi, et ce, malgré sa charge de travail importante.

Je souhaiterais remercier Pierre Baconnier qui m'a soutenu en particulier dans les moments difficiles de cette thèse. Merci aussi à Céline Fontant qui a eu la lourde tâche de synchroniser les disponibilités de Jacques Demongeot avec les miennes et qui s'est montrée toujours disponible en cas de petits soucis.

Je termine cette page de remerciements par Maribel Chenin et Guy Bourrel qui ont mis à ma disposition d'excellents moyens de calcul et qui ont supporté avec patience les heures, jours et semaines de calcul que mes mastodontes de simulations ont occupé sur ces machines.

Remerciements au jury de thèse

J'exprime toute ma reconnaissance à M. Patrick De Kepper et à M. Michel Laurent de bien avoir voulu être rapporteurs de ma thèse. Leurs critiques et appréciations sur mon travail de thèse ont, de mon point de vue, été constructives et auront mené à des améliorations du mémoire.

Je remercie également M. Laurent de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'adresse bien entendu mes remerciements à l'ensemble de mes autres examinateurs, dans l'ordre alphabétique M. Augusto Cogoli, M. Patrice Marche et M. Pierre Vignais qui, et je les en remercie, ont également pris le temps de lire mon mémoire de thèse et m'ont apporté également leurs appréciations et corrections.

Merci enfin à James Tabony et Jacques Demongeot de m'avoir soutenu avant, pendant et après à la fois l'écriture de mon mémoire et ma soutenance.

Résumé. Ce travail s'intéresse aux processus physico-chimiques sous-jacents à l'auto-organisation du vivant, par lesquels une solution de réactifs chimiques, initialement homogène, s'auto-organise spontanément pour laisser apparaître de l'ordre et des structures macroscopiques. Des théoriciens ont prédit que l'auto-organisation pouvait apparaître lors d'un couplage entre des processus réactifs et de la diffusion moléculaire. La présence ou l'absence d'un champ faible, comme la gravité, à un moment critique, précoce dans le processus d'auto-organisation, détermine l'état qui va se développer. La formation *in vitro* de microtubules, éléments essentiels du cytosquelette, se fait comme cela est prédit par les théories mentionnées précédemment. Les préparations de microtubules s'auto-organisent spontanément par des processus de réaction-diffusion, et la morphologie qui se forme alors, dépend de la présence de la gravité à un moment critique, à une étape précoce du processus. Dans nos expériences, nous avons montré qu'un phénomène associé dans les cellules vivantes, le déplacement et l'ordonnement de particules subcellulaire, se faisait *in vitro*, au cours de l'auto-organisation des microtubules. L'aspect principal du travail expérimental présenté a toutefois concerné l'étude de l'effet des champs externes sur les préparations de microtubules. J'ai montré que l'on peut obtenir des conditions d'apesanteur au sol et que, dans ces conditions, les microtubules ne s'auto-organisent pas. Ceci peut être corrigé grâce à d'autres facteurs externes. En parallèle, j'ai développé un modèle numérique de réaction-diffusion, fondé sur la dynamique d'une population de microtubules, qui simule l'auto-organisation microtubulaire. Dans ce travail sont présentés les fondements du modèle et nous discutons de la façon dont un dialogue permanent, entre la simulation et les expériences, nous a aidé à développer une compréhension microscopique de ces phénomènes collectifs. Les simulations numériques ont permis de reproduire l'ensemble des observations expérimentales.

Mots-clefs: Réaction-diffusion / structures de Turing / systèmes dissipatifs / simulations numériques / microtubules / bifurcation / champs faibles / gravité / champs magnétiques / transport ordonné.

Abstract. This work is concerned with the physical chemical processes underlying biological self-organisation by which an initially homogenous solution of reacting chemicals spontaneously self-organises so as to give rise to a preparation of macroscopic order and form. Theoreticians have predicted that self-organisation can arise from a coupling of reactive processes with molecular diffusion. In addition, the presence or absence of an external field, such as gravity, at a critical moment early in the self-organising process may determine the morphology that subsequently develops. The formation *in-vitro* of microtubules, a major element of the cellular skeleton, shows this type of behaviour. The microtubule preparations spontaneously self-organise by way of reaction and diffusion and the morphology of the state that forms depends upon the presence of gravity at a critical moment early in the process. In our experiments, I have shown that an associated phenomenon in living cells, the transport and organisation of subcellular particles, arises when microtubules self-organise *in vitro*. The principal objective of the experiments presented is the effect of weak external fields on microtubule self-organisation. I have shown that it is possible to reproduce the results of experiment carried in space using ground-based apparatus. Under these conditions there is no self-organisation. Self-organisation can be reestablished with other external fields and factors. In addition, we have developed a numerical reaction-diffusion scheme, based on the chemical dynamics of a population of microtubules, that simulates the experimental self-organisation. In this work we outline the main features of these simulations and discuss the manner by which a permanent dialogue with experiment has helped develop a microscopic understanding of the collective behaviour. The numerical simulations predict the major features of the experimental observations.

Keywords: Reaction-diffusion / Turing structures / dissipative systems / numerical simulations / microtubules / bifurcation / weak fields / gravity / magnetic fields / organised transport.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
<i>Introduction Générale</i>	2
<i>Chapitre 1. Généralités sur les systèmes complexes</i>	12
1. Les systèmes dynamiques: caractéristiques et propriétés	13
1.1. Qu'est-ce qu'un système complexe ?	13
1.2. Propriétés des systèmes complexes	14
<i>1.2.1. Ce sont des systèmes dissipatifs maintenus hors équilibre thermodynamique</i>	14
<i>1.2.2. Leur évolution est dictée par des relations non linéaires couplées</i>	15
<i>1.2.3. Les systèmes complexes ont des propriétés de bifurcation</i>	17
<i>1.2.4. Ces systèmes sont sensibles aux champs externes</i>	19
<i>1.2.5. De leur dynamique peuvent émerger de nouvelles propriétés</i>	20
2. Importance des systèmes complexes dans le vivant	21
3. Exemples de systèmes dynamiques	22
3.1. Des motifs stationnaires peuvent se former dans les fluides en mouvement	22
3.2. Les systèmes de réaction-diffusion classiques: les réactions BZ et CIMA	25
3.3. Les systèmes collectifs	26
<i>3.3.1. L'amibe sociale <u>Dictyostelium discoideum</u></i>	28
<i>3.3.2. Les insectes sociaux. L'exemple des fourmis et des termites</i>	30
<i>3.3.3. Les systèmes collectifs en informatique</i>	34
<i>Chapitre 2. Généralités sur les microtubules : comportement dynamique et auto-organisation</i>	39
1. Description générale des microtubules. Rôle des microtubules dans les cellules	39
2. Comportement des populations de microtubules <i>in vitro</i>	41
2.1. Les oscillations temporelles des solutions de microtubules	42
2.2. Auto-organisation des solutions de microtubules	44
<i>2.2.1. Description des morphologies microtubulaires auto-organisées</i>	44
<i>2.2.2. Effet de la gravitation sur le développement des morphologies</i>	46
<i>2.2.3. L'auto-organisation des microtubules est due à des processus de réaction-diffusion</i>	49
3. La dynamique réactionnelle des microtubules individuels	51
EXPERIENCES ET RESULTATS <i>IN VITRO</i>	56

<i>Chapitre 1. Mouvements de particules subcellulaires induits par l'auto-organisation des microtubules</i>	57
<i>A. Le mouvement des billes de polystyrène est lié à l'auto-organisation des microtubules</i>	59
1. Description du mouvement des billes au cours de l'auto-organisation microtubulaire	60
2. Quelle est l'origine du mouvement ?	62
2.1. L'influence du type de particule, une possibilité d'interaction avec les microtubules ?	63
2.2. Les déplacements ne sont pas la conséquence de phénomènes de convection	63
2.3. Étude quantitative du mouvement des billes de polystyrène	65
2.3.1. Vitesse des billes en fonction de la température	65
2.2.2. Influence de la concentration en tubuline sur la vitesse des billes	66
2.2.3. Influence du diamètre des billes	67
<i>B. L'auto-organisation des microtubules provoque l'ordonnement des billes</i>	68
<i>C. Conclusions des expériences sur le mouvement des particules</i>	72
<i>Chapitre 2. Effet des champs externes faibles sur l'auto-organisation des microtubules</i>	75
<i>A. Expériences en gravité réduite. Simulation d'apesantement au sol et lévitation magnétique</i>	78
1. Simulation d'apesantement au sol	78
1.1. Expériences dans la 'Free Fall Machine' (FFM)	79
1.2. Expériences dans la 'Random Positioning Machine' (RPM)	80
1.2.1. Absence du mélange des liquides dans une cuve en rotation et arrêt de la convection	81
1.2.2. Développement des morphologies dans la RPM	82
1.2.3. Random Positioning Machine en mode clinostat 2D	85
1.3. Expériences dans le clinostat 2D	85
1.4. Conclusions des expériences en apesantement simulée	91
2. Lévitation magnétique en champs magnétiques intenses	92
<i>B. Modification de l'auto-organisation des microtubules par l'ajout d'autres champs externes</i>	98
1. Effet des champs magnétiques intenses	98
1.1. Expériences en champ magnétique vertical	99
1.2. Expériences en champ magnétique horizontal	101
2. Effet des champs électromagnétiques	102
<i>C. Rétablissement de l'auto-organisation par un autre effet externe en l'absence de gravité</i>	103

1. Effet des dimensions et de la forme des échantillons.....	104
2. Effet de cisaillement dans la solution (bulles d'air, pointe de seringue, billes magnétiques)	105
3. Compensation par un champ magnétique.....	107
3.1. En lévitation magnétique sous champ intense.....	108
3.2. En appliquant un champ magnétique sur une cuve en apesanteur simulée.....	108
4. Rétablissement de l'auto-organisation sous l'action d'un champ de vibrations.....	110
<i>D. Conclusions des expériences sur les champs externes</i>	112
MODELISATION ET SIMULATIONS	114
<i>Chapitre 1. Élaboration d'un modèle d'auto-organisation d'une population de microtubules</i>	115
1. Bases moléculaires de l'auto-organisation.....	118
2. Aspects généraux du modèle.....	122
2.1. Représentation des microtubules.....	123
2.2. L'environnement chimique des microtubules.....	125
2.2.1. Formes, dimensions et maillage de l'environnement.....	125
2.2.2. Évolution de la réaction dans l'environnement chimique.....	127
2.3. La diffusion de la tubuline.....	128
2.4. Simuler la gravité ou briser l'isotropie spatiale du processus de réaction-diffusion ?	133
2.5. La communication entre les microtubules.....	135
2.5.1. Organisation par un processus de sélection.....	135
2.5.2. Organisation par un processus chimiotactique.....	136
2.5.3. Recherche des gradients de tubuline dans le modèle.....	137
3. Cinétiques réactionnelles.....	139
3.1. Croissance d'un microtubule.....	140
3.2. Décroissance d'un microtubule.....	143
3.3. Régénération de la tubuline.....	145
3.4. Destruction et nucléation des microtubules.....	146
4. Implémentation informatique.....	146
<i>Chapitre 2. Résultats des simulations numériques</i>	148
1. Cinétiques d'assemblage.....	148
2. Formation des traînées chimiques.....	152

3. Auto-organisation des microtubules.....	155
3.1. Formation de morphologies auto-organisées.....	155
3.2. Influence des paramètres sur l'auto-organisation.....	160
3.3. Simulation des champs externes et autres sources de rupture de symétrie.....	163
3.3.1. <i>Gravité et fluctuations de densité.....</i>	163
3.3.2. <i>Champs magnétiques et cisaillement.....</i>	168
3.4. Autres sources de rupture de symétrie : application à des problèmes biologiques.....	170
3.4.1. <i>Effet des parois et forme de l'échantillon.....</i>	170
3.4.2. <i>Effet d'un centre organisateur.....</i>	172
3.4.2.a. <i>Injection de tubuline.....</i>	172
3.4.2.b. <i>Centriole simulé.....</i>	174
 <i>Chapitre 3. Discussions sur le modèle d'auto-organisation proposé.....</i>	 177
 CONCLUSIONS.....	 183
 <i>Épilogue.....</i>	 189

ANNEXES	190
<i>Annexe 1. Préparation des solutions de microtubules</i>	191
<i>Annexe 2. Méthodes optiques</i>	192
2.1. Polarisation et biréfringence.....	192
2.2. Le contraste de phase interférentiel (DIC)	193
2.3. Microscopie fond noir.....	194
2.4. Fluorescence.....	194
2.5. Instruments optiques.....	195
<i>Annexe 3. Préparation des échantillons destinés à être placés en apesanteur</i>	196
<i>Annexe 4. Valeur de l'accélération centrifuge dans un clinostat en rotation</i>	197
<i>Annexe 5. Annexes des expériences en champs magnétiques</i>	198
5.1. Caractéristiques de l'aimant: aspect du champ et des gradients de champ.....	198
5.2. Détermination du point de lévitation et des valeurs de champ pour la lévitation.....	200
5.2.1. Détermination de la valeur du champ magnétique maximal dans la bobine pour provoquer la lévitation de la solution de tubuline.....	200
5.2.2. Détermination du point de lévitation et de la valeur du champ magnétique en ce point.....	201
5.3. Conception du porte-échantillons pour l'aimant: vitesse de réchauffement et position des échantillons	202
<i>Annexe 6. Équations cinétiques du modèle</i>	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205
<i>Publications Personnelles Relatives à ces Travaux</i>	225

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Fig. 1. Structures de Turing.....	17
Fig. 2. Diagramme de bifurcation.....	18
Fig. 3. Instabilité de Taylor-Couette.....	23
Fig. 4. Rouleaux de convection de Bénard.....	24
Fig. 5. La réaction de Belousov-Zhabotinski.....	26
Fig. 6. Motifs formés par l'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i>	30
Fig. 7. Formation des colonnes de fourmis.....	32
Fig. 8. L'intelligence en essaim. Le tri sélectif d'objet inerte émerge de processus collectifs.....	36
Fig. 9. Polarité structurale et réactionnelle d'un microtubule.....	40
Fig. 10. Morphologies microtubulaires auto-organisées.....	45
Fig. 11. Petites stries dans les stries.....	46
Fig. 12. Cinétiques d'assemblages des microtubules.....	47
Fig. 13. Effets de la centrifugation et détermination des morphologies microtubulaires.....	48
Fig. 14. Schéma du treadmilling.....	52
Fig. 15. Schéma de l'extrémité d'un microtubule. Capes de tubuline-GTP.....	54
Fig. 16. Évolution de la vitesse moyenne de déplacement d'une bille au cours du temps.....	61
Fig. 17. Déplacement de particules colloïdales durant l'auto-organisation des microtubules.....	62
Fig. 18. Interface dans une solution de microtubules. Absence de mouvements liquidiens.....	64
Fig. 19. Auto-organisation des billes de polystyrène.....	69
Fig. 20. Ondes de densités se déplaçant dans une population de microtubules simulés.....	71
Fig. 21. Morphologie microtubulaire auto-organisée dans la 'free fall machine'.....	80
Fig. 22. Absence de mélange de la solution dans des échantillons en rotation dans un clinostat.....	82
Fig. 23. Développement de morphologies microtubulaires dans la RPM.....	83
Fig. 24. Développement d'une morphologie dans un 'œuf de verre' dans le clinostat 2D.....	88
Fig. 25. Développement de morphologies dans un tube RMN de 8 cm dans le clinostat 2D.....	89
Fig. 26. Développement de morphologies dans des cuves de 4cm x 1cm x 1mm dans le clinostat 2D.....	91
Fig. 27. Orientation uniforme des microtubules après exposition à des champs magnétiques intenses...	94
Fig. 28. Échantillons placés dans l'aimant à 15.62 T durant 10 heures.....	96
Fig. 29. Effet de la lévitation magnétique.....	97
Fig. 30. Morphologie de type aimant.....	99
Fig. 31. Bifurcation dans un aimant horizontal.....	102
Fig. 32. Effets de cisaillement dus à des bulles d'air dans des échantillons en apesanteur.....	106
Fig. 33. Effet correctif des vibrations sur des échantillons en apesanteur dans un clinostat 2D.....	111

Fig. 34. Schéma de l'auto-organisation des microtubules par des processus collectifs.....	120
Fig. 35. Schéma de l'évolution d'un microtubule simulé dans l'environnement de tubuline.....	128
Fig. 36. La numérisation de l'équation de la diffusion produit des fronts d'ondes carrés.....	130
Fig. 37. La méthode des 'ponts cassés'.....	131
Fig. 38. Méthode discrète de recherche des zones favorables pour un microtubule en croissance.....	138
Fig. 39. Cinétiques d'assemblage d'une population de microtubules simulés.....	150
Fig. 40. Distribution de longueur des microtubules simulés après 3 heures de temps de réaction.....	151
Fig. 41. Variations de la longueur en fonction du temps d'un microtubule isolé.....	151
Fig. 42. Formation de traînées chimiques et de faisceaux de microtubules dans les simulations.....	153
Fig. 43. Phénomène d'évitement des parois par les microtubules.....	155
Fig. 44. Simulation d'une population de microtubules.....	156
Fig. 45. Comparaison entre le motif microtubulaire in vitro et celui obtenu par simulation.....	159
Fig. 46. Fluctuations de densité dans la solution de microtubules simulée à la 6ème minute.....	164
Fig. 47. Influence d'un biais directionnel dans le processus de réaction-diffusion microtubulaire.....	165
Fig. 48. Simulation de l'effet d'un champ magnétique sur le processus d'auto-organisation.....	169
Fig. 49. Simulation dans un tube de 300 μm x 20 μm et effet des parois.....	171
Fig. 50. Auto-organisation des microtubules autour d'une source ponctuelle de tubuline-GTP.....	174
Fig. 51. Auto-organisation des microtubules libres autour d'un centriole simulé.....	175
Fig. 52. Courbe de champ et de gradient de champ de l'aimant de lévitation magnétique.....	199

INTRODUCTION

Introduction générale

Le comte de Buffon étonne par son œuvre davantage fondée sur des intuitions et un grand nombre d'observations dans le domaine des sciences naturelles, que sur de réelles analyses scientifiques. Il partageait notamment la vision d'Aristote en écrivant "*un [autre] de ses principes étoit que la matière d'elle-même est informe, & que la forme est un être distinct & séparé de la matière*" [Buffon (a)]. Si Aristote et Buffon ne disposaient certainement pas des connaissances que nous avons maintenant sur la matière, leur intuition ne les trompait pourtant pas quand ils pensaient que la génération d'ordre et de formes est un phénomène indépendant des composants du système ou de leur nature. En tout cas, cela est souvent vrai pour une catégorie importante de systèmes organisés dans la nature : les systèmes complexes. Dans de tels systèmes, l'observation des composants détaillés de la matière n'apporte effectivement pas de renseignements sur la façon dont se forme et s'organise un système. La génération d'ordre et de formes se fait par des phénomènes 'génériques' qui tiennent davantage à la façon dont les éléments d'un système réagissent et communiquent entre eux. On ne peut par exemple pas comprendre comment se forme une fourmilière à partir de la simple connaissance d'une fourmi ou même de celle de chacune des fourmis de cette fourmilière. On ne peut pas non plus expliquer la formation d'un vortex dans une baignoire en étudiant la molécule d'eau ni même chacune des molécules d'eau contenues dans la baignoire. De la même façon, les microtubules, éléments essentiels du squelette des cellules vivantes, s'auto-organisent entre eux par ces processus non linéaires, hors équilibre thermodynamique, et non par des interactions statiques, comme cela se passe dans les solutions de cristaux liquides. C'est justement la façon dont s'auto-organisent ces macromolécules biologiques que nous nous proposons d'expliquer.

Si la génération spontanée d'ordre et de formes est une caractéristique essentielle et facilement observable dans les systèmes vivants, il est moins évident d'en saisir les mécanismes sous-jacents. À force de côtoyer les systèmes complexes et leur non linéarité, et d'observer la richesse des comportements du vivant, on en vient à douter systématiquement de toute idée ou hypothèse formulée sur les mécanismes à l'origine de leur comportement. Il est facile de se perdre dans la description d'un comportement en se limitant à une compréhension linéaire des séquences d'évènements qui ont lieu dans un système. A partir de la simple

observation d'un système de ce type, il est donc difficile de comprendre quels sont les mécanismes mis en œuvre pour y faire émerger de l'ordre. L'approche non linéaire que nous impose la compréhension des systèmes auto-organisés, et notamment des systèmes vivants, fait donc davantage appel à un processus de réflexion reposant sur l'intuition. On ne peut en général que se faire une idée approchée des mécanismes impliqués, et ce souvent par analogie avec d'autres systèmes mieux connus et qui ont un comportement semblable. Par exemple, nous le verrons, nous-mêmes avons souvent fait une comparaison entre les populations de microtubules et les colonies de fourmis. C'est dans ce cadre théorique que la modélisation permet d'établir un lien entre chaque élément d'un système et le comportement global de ce dernier. L'apport de la modélisation dans le domaine de la complexité et des systèmes dynamiques, en permettant de vérifier par des calculs mathématiques et des simulations numériques ces idées intuitives, a contribué à faire de cette approche récente une science à part entière. C'est, nous le verrons, cette approche, à la fois théorique et expérimentale, qui nous a amenés à une meilleure compréhension des mécanismes microscopiques qui conduisent à une organisation macroscopique des solutions de microtubules et qui impliquent la réactivité des microtubules et leur 'intercommunication'.

Les premières descriptions et idées conceptuelles sur le fonctionnement des systèmes dynamiques et plus précisément des systèmes spatialement auto-organisés se sont faites à propos des systèmes vivants, des organismes individuels aux écosystèmes plus complexes. Le fonctionnement des systèmes vivants et en particulier la physiologie des organismes, ainsi que l'embryogenèse et la morphogenèse, sont des questions qui se sont rapidement imposées parmi les philosophes du XVII^{ème} et du XVIII^{ème} siècle (Voltaire [Voltaire, 1757], Buffon [Buffon, 1747], Descartes [Descartes, 1648]), s'opposant à la vision mystique alors usuelle, de ces phénomènes. Avant cela, toute explication d'un quelconque phénomène été censée trouver une origine religieuse. Par exemple, avant Galilée, lorsqu'une pierre jetée en l'air tombait en un endroit, on ne se posait pas la question de comment elle tombait, mais pourquoi, et la réponse était invariablement, parce que Dieu a décidé qu'elle devait reposer là [Stewart 1989].

D'où proviennent les êtres vivants ? Comment se forment t-ils ? Comment fonctionnent-ils ? Buffon avec son idée du "moule intérieur", suivi de Claude Bernard et "l'homéostasie du milieu intérieur" s'interrogeait déjà sur la dynamique interne, le développement et la transformation progressive des organismes. Cependant, on peut dire que ce n'est vraiment qu'au début du 20^{ème} siècle que la question de l'auto-organisation en biologie a pris un caractère formel et mathématique. Dans son ouvrage intitulé "On growth and form"

publié en 1917 [Thompson, 1917], le naturaliste écossais Thompson D'Arcy propose, pour dépeindre la forme et le développement des êtres vivants, une description des formes en procédant par analogie avec les systèmes physiques, et une explication du développement par des transformations géométriques. Thompson d'Arcy était en effet persuadé de la présence de lois physiques et mathématiques dirigeant l'apparition et la croissance des formes naturelles. Sa démarche pouvait sembler peu rationnelle mais, d'une part il est difficile, voire impossible en biologie de fournir une preuve absolue de ce que l'on avance, ce privilège restant l'apanage des sciences dites exactes comme les mathématiques, d'autre part Thompson d'Arcy était davantage un zoologue expérimentateur qu'un théoricien.

À partir des années 30, certains théoriciens ont prédit que certains systèmes, de par leurs dynamiques particulières, pourraient être à l'origine des formes et de l'ordre dans les systèmes vivants. En 1937, le mathématicien russe Andreï N. Kolmogorov, accompagné de I. G. Petrovsky et N. S. Piskunov, décrit, quinze années avant Alan Turing, l'évolution de deux phénotypes, dominant et récessif, dans une espèce animale en utilisant des équations comprenant des termes 'réactifs' couplés à des termes 'diffusifs' [Kolmogorov et al, 1937]. Les termes 'réactifs' décrivent l'évolution locale du nombre d'individus en fonction des avantages et inconvénients respectifs liés aux caractères génétiques. Les termes 'diffusifs', eux, permettent de modéliser la dissémination des différents phénotypes. Curieusement, alors qu'il avait tous les éléments en main pour parvenir aux mêmes résultats que Turing, Kolmogorov n'est pas allé plus loin que la description mathématique de ce comportement simple de croissance associée à de la diffusion. Nicholas Rashevsky quant à lui, montre également, dans les années 40, que des lois mathématiques simples peuvent suffire à expliquer des comportements biologiques complexes [Rashevsky 1940, Rashevsky 1948]. Ce n'est cependant qu'en 1952 que le mathématicien anglais Alan Turing qui s'interrogeait sur le problème de la morphogenèse, a démontré mathématiquement que des réactions chimiques couplées entre elles et couplées à des processus de transport pouvaient, dans certaines conditions, aboutir à la formation auto-organisée de motifs de concentration des réactifs dans une solution [Turing, 1952]. Une telle approche constitue un changement important de paradigme, les réactions chimiques n'ayant habituellement pas ce type de comportement et la diffusion moléculaire ayant tendance à homogénéiser les solutions chimiques, donc détruire l'ordre qui pourrait s'y former.

Cette approche théorique ne s'est plus développée depuis la mort de Turing en 1954, jusqu'aux travaux d'Ilya Prigogine, Grégoire Nicolis et Paul Glansdorf dans les années 60 à 80. Ils ont montré que la formation de ces structures auto-organisées se faisait hors équilibre

thermodynamique [Glansdorff and Prigogine, 1971]. Prigogine les a nommées 'structures dissipatives' en raison de leur consommation permanente d'énergie [Nicolis and Prigogine 1977, Nicolis and Prigogine 1989]. Ces auteurs ont aussi montré que ces systèmes sont capables de propriétés dites de bifurcation sous l'action d'un faible effet externe, tel que la gravité, à un moment critique, tôt dans le processus d'auto-organisation. Ils ont ainsi explicitement calculé que la gravité terrestre peut agir sur des fluctuations de densité apparaissant dans un système de réaction-diffusion, à un moment précoce dans le développement du système [Kondepudi and Prigogine 1981, Kondepudi 1982].

L'ensemble de ces travaux reste cependant très théorique. Des systèmes chimiques oscillants avaient déjà été observés au 19^{ème} siècle dans les systèmes en phase gazeuse et au début du 20^{ème} siècle dans les liquides [Bray, 1921]. W.C Bray en particulier avait proposé que ces réactions pourraient bien être en rapport avec ce que A. J. Lotka avait montré de façon théorique, à savoir la possibilité d'observer des cinétiques chimiques oscillantes dans le temps, faisant intervenir toute une série d'espèces réactives intermédiaires [Lotka, 1910]. En 1951, un physicien russe, B. P. Belousov, découvre une de ces réactions chimiques 'contre-nature', ayant un comportement temporel oscillatoire [Belousov, 1951]. À l'époque, ses travaux sont rejetés, sous prétexte qu'il ne pouvait s'agir que d'une erreur ou d'un artéfact et Belousov ne parvient à les publier qu'en 1958 [Belousov, 1958]. Dans les années soixante, un autre russe, A. M. Zhabotinski, a montré qu'une variation de la réaction chimique de Belousov s'auto-organisait dans un tube à essais selon une striation périodique [Zhabotinski, 1967]. C'est Prigogine qui, enfin, cite cette réaction nommée réaction BZ (Belousov-Zhabotinski) comme le premier exemple d'une réaction auto-organisée de 'type Turing', obtenue expérimentalement. Malheureusement, la plupart des scientifiques ont préféré ne pas croire cette explication. Dans un contexte scientifique encore très cartésien dans lequel toute action a des conséquences qui lui sont directement proportionnelles, l'émergence spontanée d'ordre et de formes à partir d'une solution de produits chimique initialement homogène tient de l'erreur expérimentale ou du miracle. Le philosophe anglais John Locke disait qu' "*un miracle est une opération sensible, que le Spectateur regarde comme divine parce qu'elle est au-dessus de sa portée, contraire même à ce qu'il croît, aux Lois établies de la Nature*" [Locke, 1702-1704]. C'est aussi souvent le cas en ce qui concerne les grandes avancées scientifiques. Ce n'est donc que 40 ans plus tard, en 1990, qu'une autre réaction chimique, la réaction CIMA, une variation de la réaction de Briggs et Rauscher - une des deux principales réactions chimiques oscillantes avec la réaction BZ - effectuée dans un gel a enfin été reconnue comme le premier exemple d'une structure de ce type [Castets et al 1990, Ouyang and Swinney 1991]. Au même

moment, J. Tabony et D. Job découvraient le premier exemple de formation d'une structure dissipative auto-organisée dans un système biologique *in vitro* [Tabony and Job 1990].

Si le vivant offre à nos yeux toute la richesse des comportements prévus par ces théories, il restait pourtant à prouver expérimentalement que de tels processus avaient bien lieu dans les systèmes vivants, et en particulier de montrer que des molécules biologiques sont capables de s'auto-organiser entre elles pour former de l'ordre macroscopique. Plusieurs auteurs ont comparé les morphologies qui apparaissent dans les organismes vivants avec des prédictions mathématiques reposant sur ces théories [Meinhardt 1982, Harrison 1987, Murray 1990, Cox 1992, Harrison 1993]. La plupart de ces travaux théoriques portent d'ailleurs sur la morphogenèse (ex: l'embryogenèse de la mouche drosophile [Meinhardt 1982, Hunding et al 1990, Papaseit 1998, Papaseit et al 1999]) et sur la formation de motifs chez les êtres vivants [Bard, 1981] (ex: les rayures des poissons zèbres [Asai, 1999], du poisson ange *Pomacanthus* [Kondo et Asai, 1995] ou encore les taches du léopard). Certains ont même montré *in vivo*, l'apparition de structures probablement liées à des processus de réaction-diffusion, par exemple la formation d'ondes de calcium traversant le cytosol des œufs néo-fécondés [Lechleiter et al 1991, Girard et al 1992, Dupont et Goldbeter 1992], mais aussi les motifs qui se forment dans les colonies d'amibes *Dictyostelium discoideum* [Cohen and Robertson 1971, Martiel and Goldbeter 1987, Tyson et al 1989] ou de bactéries [Ben-Jacob et al, 1994]. Cependant, jusqu'à récemment, il n'y avait aucun exemple *in vitro* d'un système biochimique simple s'auto-organisant dans un tube à essai par des processus de ce type. En 1990, J. Tabony et D. Job ont montré le premier exemple de formation d'une structure dissipative auto-organisée dans un système biologique *in vitro*. Les expériences qui ont été réalisées par la suite par l'équipe de J. Tabony ont montré que les solutions *in vitro* de microtubules suivent le comportement prévu par les théories mentionnées précédemment, à savoir une auto-organisation macroscopique due à des processus de réaction et de diffusion nécessitant une dissipation permanente d'énergie, et une nette sensibilité vis-à-vis de la gravité.

Lorsque l'on met à assembler de la tubuline en présence de GTP dans un tube à essais à 35°C, des microtubules se forment et, dans certaines conditions, on observe la formation progressive de morphologies microtubulaires auto-organisées à un niveau macroscopique qui présentent des alternances d'orientation [Tabony and Job 1992-a] et de concentration des microtubules [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. De très nombreuses expériences ont été faites sur ces structures pour en déterminer toutes les caractéristiques. Très rapidement, il a été suspecté que ces morphologies se formaient par des processus de

réaction-diffusion comme des structures de Turing. Effectivement, il a été montré que ces structures microtubulaires possédaient des caractéristiques et propriétés très semblables à celles des structures de 'type Turing'. Tout d'abord, des mesures de consommation d'énergie chimique (GTP), faites par résonance magnétique nucléaire du Phosphore, ont permis d'établir que la formation de ces structures était dynamique, car elle nécessitait une consommation permanente d'énergie chimique [Tabony and Job 1990]. Ensuite, les morphologies formées dépendent de leur orientation par rapport à direction de la gravité. Elles sont donc sensibles aux champs externes faibles [Tabony and Job 1992-b]. Ces structures possèdent effectivement des propriétés de bifurcation puisque les expériences ont montré que la gravité n'agissait qu'à un moment critique, précoce dans le processus d'auto-organisation, correspondant à une instabilité chimique dans la réaction. La morphologie qui se forme progressivement à partir de cet instant critique, dépend de l'orientation de l'échantillon vis à vis de la gravité au moment d'instabilité [Tabony 1994, Tabony 1996-b]. Des expériences faites en apesanteur dans une fusée sonde de l'agence spatiale européenne ont confirmé ceci: les solutions de microtubules s'assemblent mais ne s'auto-organisent pas quand elles sont soumises à une courte période d'apesanteur (13 minutes) couvrant cet instant critique [Papaseit et al 2000, Tabony et al 2001-a]. Cette dernière expérience est également un élément important prouvant que ces solutions ne s'auto-organisent pas par des interactions statiques. Un dernier point important pour dire que ces structures sont apparentées aux structures de Turing est que leur formation doit faire intervenir des processus réactifs couplés à des phénomènes de transport. En plus de cela, les morphologies formées doivent correspondre à des motifs de concentration. Un très grand nombre d'expériences visant à modifier les paramètres réactifs et diffusifs de la solution ont été réalisées [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Toutes ont confirmé que ces morphologies se formaient par des processus de réaction-diffusion. De plus, des mesures faites en diffusion de neutrons aux petits angles, et confirmées par des expériences de fluorescence des microtubules, ont révélé un motif de concentration en microtubules corrélé avec leur motif d'orientation [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Un motif strié, alternant périodiquement des zones de forte concentration en microtubules et des zones où cette concentration chute de 30%, a été observé. L'ensemble de ces observations constitue une grande avance en biologie car jusqu'alors, ce genre d'exemples, montrant la formation spontanée d'ordre et de formes à partir d'une solution de molécules biologiques *in vitro*, demeurait inexistant.

L'étude de l'auto-organisation des microtubules se cantonne malheureusement à une vision globale des processus. Les bases moléculaires décrivant la façon dont les microtubules

s'auto-organisent entre eux demeuraient inconnues. Au cours des discussions au laboratoire, une hypothèse est apparue plausible pour expliquer l'auto-organisation des microtubules. Cette hypothèse est que les microtubules s'auto-organisent entre eux à la manière des insectes sociaux tels que les fourmis, c'est-à-dire en laissant derrière eux des traces chimiques que d'autres microtubules pourraient suivre par une sorte de chimiotactisme [Communications privées (a)]. De plus, si l'action de la gravité et des autres champs externes faibles sur le processus d'auto-organisation pouvait être comprise à un niveau global, il restait difficile de comprendre ses implications au niveau moléculaire. L'objectif du travail présenté dans ce manuscrit était donc double. Il s'agissait tout d'abord d'utiliser cette approche conceptuelle des traînées chimiques comme base pour élaborer un modèle d'auto-organisation par des processus de réaction-diffusion. Ce modèle est le seul moyen de vérifier l'hypothèse faite, concernant le mécanisme moléculaire de l'auto-organisation. Ensuite, il fallait s'employer à déterminer, à la fois par les expériences et par simulations numériques, la façon dont les champs externes interviennent et contrôlent le processus d'auto-organisation. Nous montrerons que notre modèle fondé sur des processus de réaction-diffusion et faisant intervenir la dynamique collective d'une population de microtubules représentés individuellement, permet de reproduire tous les comportements observés au cours des expériences que nous avons mené: auto-organisation, sensibilité vis-à-vis des champs externes et des autres sources de rupture de symétrie, mouvements ordonné de particules colloïdales.

Les microtubules [Alberts et al 1983, Dustin 1984] sont des tubes de 24 nm de diamètre, pouvant atteindre une longueur de plusieurs micromètres. Ces macromolécules biologiques sont des assemblages constitués d'une protéine, la tubuline. Leur assemblage se fait par ajouts successifs de molécules de tubuline. Cela consomme beaucoup d'énergie, puisque l'ajout de chaque molécule de tubuline s'accompagne de l'hydrolyse d'une molécule énergétique de la cellule s'apparentant à la molécule bien connue d'ATP, le GTP (ou Guanosine Triphosphate) en GDP (ou Guanosine Diphosphate). Le fait que la réaction de formation des microtubules et que leur auto-organisation s'accompagne d'une consommation permanente d'énergie en fait un processus dissipatif [Tabony and Job, 1990]. La façon dont se forment ou se détruisent les microtubules n'est pas dictée par des lois linéaires, rendant, de ce fait, l'étude de leur comportement individuel ou collectif, difficile.

Ces longs assemblages dynamiques constituent, avec l'actine, un des éléments majeurs du squelette des cellules, le cytosquelette. Ils ont un rôle absolument vital dans les cellules, puisqu'en plus de contrôler leur organisation interne et leur forme, ils contribuent activement à

un grand nombre de leurs fonctions. Le fuseau mitotique qui se forme lors de la division cellulaire est constitué de microtubules. Ces derniers permettent notamment la séparation des chromosomes des deux futures cellules filles. Le transport intracellulaire du matériel biologique dans des vésicules lipidiques ou dans des prosomes, est un autre exemple de processus cellulaire dans lequel les microtubules sont requis.

Il est maintenant établi que l'effet de substances modifiant la dynamique des microtubules dans les cellules provoque leur désorganisation et de sérieux dysfonctionnements [Alberts et al 1983]. C'est à partir du moment où les expériences sur les solutions auto-organisées de microtubules *in vitro* ont montré leur propriété de bifurcation [Tabony 1994, Tabony 1996-b] et leur sensibilité vis-à-vis de la gravité [Tabony and Job 1992-b], que les biologistes ont commencé à regarder la distribution des microtubules dans des cellules vivantes envoyées dans l'espace. Les expériences faites en apesanteur sur des cellules vivantes montrent également une désorganisation du cytosquelette et un mauvais fonctionnement des cellules [Hughes-Fulford et al 1996, Cogoli-Greuter et al 1998, Lewis et al 1998, Vassy et al 2001]. D'autres champs, comme les champs magnétiques [Ueno and Iwasaka 1996, Denegre et al 1998] ou les champs électromagnétiques [Barnes 1989], ont des effets biologiques sur les cellules vivantes. Les processus mis en œuvre dans notre système *in vitro*, pourraient bien expliquer la gravisensibilité des cellules, les microtubules se comportant *in vitro* comme des 'gravirécepteurs'. Devant cette importance, on comprend donc tout l'intérêt que nous avons à déterminer quels sont les processus microscopiques qui conduisent à l'auto-organisation des microtubules à un niveau macroscopique, et la manière avec laquelle la gravité ou d'autres champs externes comme les champs magnétiques, peuvent interagir avec les solutions de microtubules et modifier leur comportement.

Les objectifs de cette thèse étaient de comprendre de quelle manière se fait l'auto-organisation microtubulaire, c'est-à-dire de comprendre de quelle manière une foule de processus microtubulaires microscopiques peut aboutir à une organisation macroscopique, sous l'action d'une perturbation externe, s'appliquant à la population de microtubules toute entière. Pour cela, ce travail de thèse a été réalisé selon deux approches complémentaires : une approche expérimentale, et une approche plus théorique s'appuyant sur un modèle et des simulations numériques, l'ensemble de ce travail étant fondé sur les concepts d'auto-organisation par des processus dynamiques évoqués précédemment.

Avant d'aborder la présentation des résultats expérimentaux et la description de la modélisation, il paraît important d'établir le cadre théorique dans lequel se situe notre approche de l'auto-organisation microtubulaire, tant sur le plan de l'interprétation des résultats expérimentaux que de la modélisation. Une présentation générale des systèmes dissipatifs sera donc préalablement faite, en insistant particulièrement sur une description et des exemples de systèmes collectifs, cas particuliers des systèmes auto-organisés. Nous verrons en effet que ce sont nombre de réflexions sur des systèmes aussi variés que les systèmes collectifs et les réactions chimiques hors équilibre, qui nous ont amenés à la mise en place progressive d'un modèle et qui nous ont conduits à notre vision actuelle du processus d'auto-organisation microtubulaire.

Cette partie introductive sera poursuivie par une description générale des microtubules et de leur fonctionnement. Dans ce paragraphe, nous décrirons le comportement dynamique des solutions de microtubules et leurs capacités d'auto-organisation, tel que tout cela est connu actuellement.

La partie expérimentale de ce travail comporte deux aspects. Nous nous attachons tout d'abord à montrer qu'un phénomène associé, comme le mouvement de particules en solution, peut être compris comme une propriété émergente, directement liée à l'auto-organisation des microtubules. Ainsi, nous nous sommes intéressés à décrire et quantifier le mouvement ordonné et l'auto-organisation de particules de taille subcellulaire inertes, telles que des billes micrométriques de polystyrène, dans les solutions de microtubules. Ceci a été fait en filmant le mouvement des particules, ainsi que l'auto-organisation des microtubules, par une technique de polarisation croisée. Les trajectoires de chaque particule ont été tracées et des données quantitatives concernant l'évolution de leur vitesse de déplacement au cours du temps ont été obtenues. Différentes conditions réactives ont été testées afin de d'établir la relation étroite qui existe entre l'auto-organisation des microtubules et le mouvement ordonné de ces particules. Habituellement, les biologistes considèrent que les mouvements de vésicules associés au cytosquelette sont dus à des moteurs moléculaires, protéines capables de se déplacer le long des fibres du cytosquelette. Le phénomène que nous décrivons pourrait bien constituer, dans les cellules vivantes, un nouveau moyen de convertir de l'énergie chimique en mouvement et ce, même en l'absence de moteurs moléculaires.

Nous avons ensuite étudié l'action des champs externes sur les solutions de microtubules. Après une étude systématique de l'effet de différents champs sur l'auto-organisation, nous montrons comment, dans certaines conditions de gravité réduite, nous parvenons à l'empêcher. Nous montrons cependant qu'il est possible de corriger l'effet

'inhibiteur' de l'apesanteur en appliquant d'autres champs que la gravité. La plupart de ces expériences ont été faites dans des appareils - aimants supraconducteurs et résistifs, antennes micro-ondes, simulateurs d'apesanteur (clinostats) - en collaboration avec d'autres laboratoires. Outre le fait de fournir un mécanisme possible expliquant la gravisensibilité des organismes vivants au niveau cellulaire, une telle étude permet d'envisager des moyens thérapeutiques pour contrer les effets néfastes de l'apesanteur ou potentiellement ceux d'autres champs externes.

Bien que l'approche théorique et les calculs aient été complémentaires des expériences *in vitro* et menés parallèlement durant le travail de thèse, par souci de clarté, nous ne la décrivons qu'à la suite de la partie expérimentale. Cette partie concerne la conception d'un modèle d'auto-organisation des microtubules et son implémentation par des simulations numériques. Le modèle que nous avons conçu est un type d'automate cellulaire, fondé à la fois sur des processus de réaction-diffusion classiques et sur la dynamique collective d'une population de microtubules représentés individuellement. Il répond à notre interrogation quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents aux fondements de l'auto-organisation des microtubules, en nous permettant notamment de vérifier notre hypothèse première: les microtubules s'auto-organisent entre eux par processus dynamiques de réaction-diffusion, faisant intervenir une forme de communication chimique entre chacun des individus de la population. Les effets des champs externes tels que la gravité ou les champs magnétiques ont été simulés. Leur effet peut être compris comme le fait d'introduire un biais global dans l'orientation initiale de quelques microtubules, à une phase précoce du processus d'auto-organisation.

Les résultats des expériences, analysés dans le contexte théorique des systèmes dynamiques hors équilibre et couplés aux résultats des simulations numériques, donnent, nous le verrons, de précieux renseignements sur la façon dont s'auto-organisent les solutions de microtubules. Une synthèse intégrant l'ensemble de nos réflexions à ce propos et faisant bien ressortir la complémentarité entre expériences et simulations dans ce travail, clôturera le manuscrit. Nous en profiterons pour justifier le sens biologique d'une telle étude: en quoi les processus collectifs de réaction-diffusion que nous avons étudiés peuvent-ils jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette dans les cellules et dans les fonctions qui lui sont associées ?

Chapitre 1 - Généralités sur les systèmes complexes

Il y a près de trois siècles, Monsieur de Voltaire s'interrogeait déjà sur la façon dont pouvait émerger le vivant et sur les lois qui gouvernent cette émergence. Il ne connaissait pas ces lois qui, à partir d'une matière homogène à l'origine à la fois de tous les êtres vivants et des objets inertes, peuvent, dans certaines conditions, amener à la naissance d'ordre et de formes et parfois de systèmes vivants. En admirateur de Newton, il suspectait le mouvement d'être en partie à l'origine de la génération d'ordre dans la nature, mais il savait bien aussi que d'autres lois devaient gouverner ces phénomènes, des 'Lois de la Nature' que seul le "*Maître du Monde*" détient. "*Si la matière quelconque mise en mouvement suffisait pour produire ce que nous voyons sur la terre, il n'y aurait aucune raison pour laquelle de la poussière bien remuée dans un tonneau ne pourrait pas produire des hommes & des arbres, ni pourquoi un champ semé de bled ne pourrait pas produire des baleines & des écrevisses au lieu de froment. C'est en vain qu'on répondrait que les moules & les filières qui reçoivent les semences s'y opposent, car il faudra toujours revenir à cette question : pourquoi ces moules, ces filières sont-elles si invariablement déterminées ? Or si aucun mouvement, aucun art ne peut faire venir des poissons au lieu de bled dans un champ, ni des neffles au lieu d'un agneau dans le ventre d'une brebis, ni des roses au haut d'un chêne, ni des soles dans une ruche d'abeilles, &c. si toutes les espèces sont invariablement les mêmes, ne dois-je pas croire d'abord avec quelque raison que toutes les espèces ont été déterminées par le Maître du Monde, qu'il y a autant de desseins différents qu'il y a d'espèces différentes, & que de la matière & du mouvement, il ne naîtrait qu'un cahos éternel sans ces desseins.*" [Voltaire (a)]

C'est de ces lois qui gouvernent la formation des êtres et structures auto-organisées dont nous allons parler dans ce chapitre. C'est par leur truchement qu'apparaissent et évoluent ces systèmes complexes.

Toutes les notions et exemples qui sont présentés dans ce chapitre, si différents soient-ils de notre système, ont servi à la fois à concevoir le modèle et ont servi de base pour la compréhension des processus que nous avons observés expérimentalement et en simulation. Car, dans le domaine des systèmes complexes et, plus généralement, quand on s'attaque aux problèmes que nous pose la nature, c'est la connaissance de nombreux exemples de ces

différents systèmes qui nous indique en quelle partie regarder dans notre propre système et de quelle façon [Buffon (b), Bak 1996, Gleick 1987].

Dans ce chapitre, nous commencerons par décrire ces systèmes, les lois qui les gouvernent et leurs propriétés particulières. Nous en donnerons ensuite quelques exemples.

1. Les systèmes dynamiques : caractéristiques et propriétés

1.1. Qu'est ce qu'un système complexe ?

Introduire les systèmes complexes est une vaste entreprise. On peut dire simplement que ce sont des systèmes dynamiques composés d'un nombre suffisant d'entités (en général un grand nombre) qui sont capables de montrer une grande variété de comportements, naissant notamment d'un couplage de quelque type que ce soit entre ces entités. Dans un tel système, malgré la simplicité des relations qui peuvent exister au niveau individuel, les comportements du système pris dans sa globalité peuvent s'avérer d'une grande complexité et d'une grande variété. En effet, à la différence d'un circuit électronique intégré par exemple, un système complexe n'est pas compliqué, car chacun de ses éléments est simple et en général semblable aux autres. Le fait qu'un circuit imprimé soit compliqué ne vient que du nombre important de composants différents et de leur enchevêtrement inextricable. Mais ce circuit imprimé est dessiné et réalisé selon un plan conçu à l'avance, ce qui n'est pas le cas des systèmes complexes auto-organisés. Dans les systèmes complexes, aucun plan du comportement futur du système n'est nécessaire ni utilisé, car ce dernier émerge de la dynamique collective des individus qui le forment.

La complexité intervient dans l'organisation spatio-temporelle de très nombreux systèmes dans la nature, jusque dans les activités humaines, par exemple en chimie [Castets et al 1990, Ouyang and Swinney 1991, Whiteside and Ismagilov 1999], en écologie et dynamique des populations [Helbing et al 1997, Parrish and Edelstein-Keshet 1999, May 1986], en économie [Arthur 1999], en médecine [Goldberger 1996], en météorologie [Lorenz 1963]. D'une façon plus générale, ce sont donc des systèmes dont on peut décrire l'évolution de leurs comportements particuliers par des relations non linéaires, révélant le couplage qui existe entre leurs constituants. Pour pouvoir exister et présenter certains types de comportements, ces systèmes doivent avoir un certain nombre de propriétés. Leurs propriétés générales, telles qu'elles ont été formulées par plusieurs théoriciens, sont énumérées ci-dessous.

1.2. Propriétés des systèmes complexes

1.2.1. *Ce sont des systèmes dissipatifs maintenus hors équilibre thermodynamique*

Dans la nature, les systèmes complexes sont maintenus hors de l'équilibre thermodynamique par une consommation permanente d'énergie [Glansdorff and Prigogine 1971, Nicolis and Prigogine 1977, Nicolis and Prigogine 1989]. Leur comportement s'oppose en effet à la 2^{ème} loi de la thermodynamique selon laquelle un système tend irrémédiablement vers l'entropie maximale. Cela aboutit progressivement à un état stable et homogène, dans lequel règne un désordre moléculaire maximal : il rejoint l'équilibre thermodynamique. Et, même si on le perturbe un peu, il revient progressivement à l'équilibre. Par exemple, lorsqu'on dépose une goutte de colorant dans de l'eau, l'ensemble de la solution s'homogénéise peu à peu par diffusion, et il n'en résulte qu'une solution de colorant uniformément dilué dans l'eau et non un motif coloré organisé. Dans les systèmes dynamiques hors équilibre, la 2^{ème} loi de la thermodynamique reste vraie, mais la dynamique du système permet de générer suffisamment d'ordre pour s'opposer à la maximisation de l'entropie.

L'énergie consommée est donc le moteur de cette dynamique. Cette énergie peut être de plusieurs formes : elle peut être chimique (ex : systèmes chimiques de réaction-diffusion), mécanique (motifs turbulents dans le système de Couette-Taylor [Taylor 1923, Koschmieder and Pallos 1974]), calorifique (cellules de convection de Bénard [Bénard 1900, Rayleigh 1916, Velarde and Normand 1980])... Dans les systèmes de réaction-diffusion par exemple, c'est le flux d'énergie chimique dissipée qui permet aux réactions de s'opposer à l'homogénéisation du milieu par diffusion. Il est en effet "*plus aisé de détruire que d'établir*"; "*La nature en général [me] paroît tendre beaucoup plus à la vie qu'à la mort, il semble qu'elle cherche à organiser les corps autant qu'il est possible*" [Buffon (c)]. Des réactifs sont consommés de façon irréversible et permettent la naissance de motifs chimiques. Quand la solution vient à manquer de réactifs, la réaction ne peut plus continuer et les motifs qui ne sont plus entretenus disparaissent peu à peu. Un autre exemple est un système collectif composé d'une population d'animaux. Dans ce cas, l'énergie est dépensée pour leur survie, par l'effort que constitue le déplacement des individus dans l'environnement et les relations (communication, reproduction ...) qu'ils entretiennent entre eux. Si plus aucune source de nourriture n'est disponible dans leur environnement, ces animaux meurent et n'ont pas assez d'énergie pour se déplacer et entretenir des relations avec les autres individus. D'une société

bien structurée d'animaux, on tend peu à peu vers une individualisation et une perte de la cohésion de cette société. Plus généralement, les systèmes vivants sont tous des systèmes dissipant de l'énergie pour maintenir leur intégrité et rester en vie. Leur mort coïncide avec l'arrêt de toute consommation d'énergie. Peu à peu, l'organisme éteint se dégrade et sa matière constitutive est libérée dans la nature. D'une forme organisée des constituants de cet organisme, on passe à une forme entropique dans laquelle ils ont perdu toute cohérence.

Précisons toutefois que, dans la modélisation mathématique de tels systèmes, l'énergie est souvent exprimée de façon implicite et les termes de dissipation d'énergie n'apparaissent pas dans les équations du système. Effectivement, on cherche en général à étudier l'évolution d'un système dans des conditions d'énergie non limitantes, donc on suppose ce dernier en excès d'énergie durant toute la durée de l'observation. C'est également le choix que nous avons fait dans notre modèle.

1.2.2. Leur évolution est dictée par des relations non linéaires couplées

Ce qui caractérise avant tout les systèmes complexes, ce sont leurs dynamiques non linéaires. Les systèmes complexes sont en effet composés de plusieurs corps (animal, molécule, planète...) qui interagissent entre eux au cours de l'évolution du système. Le couplage des différentes entités d'un système complexe se traduit par des termes croisés dans les équations décrivant l'évolution de chacune de ces entités : l'évolution de l'une d'entre elles dépend de l'évolution des autres et réciproquement. Par exemple, la non linéarité peut se traduire par des termes d'auto-activation ou d'auto-inhibition, ou encore, dans le cas de termes croisés, à de l'activation ou de l'inhibition mutuelle entre deux entités (ou plus) composant le système. La dynamique de chacune des entités d'un système complexe peut être très simple, mais c'est le fait que chacune de ces entités soit couplée avec les autres qui génère une dynamique collective complexe [May, 1976]. En plus des termes croisés, une autre composante du couplage est due aux phénomènes de transport de matière et de communication entre les constituants du système.

Les couplages de ce type sont très présents dans les systèmes vivants. Citons par exemple les sociétés animales ou les systèmes proies-prédateurs (ex : lynx et lièvres [Edelstein-Keshet 1988]) dans lesquelles les individus sont couplés entre eux, ou encore les réactions métaboliques faisant intervenir un grand nombre de constituants interagissant les uns avec les autres de façon non linéaire [Thomas and D'Ari 1990]. Dans ces systèmes, on

retrouve ces termes d'activation et d'inhibition autologue ou hétérologue, ainsi que des termes de transport (déplacement des animaux ou diffusion moléculaire).

En 1952, le mathématicien anglais Alan Turing a prédit que des réactions chimiques faisant intervenir des molécules activatrices et des molécules inhibitrices, couplées à de la diffusion moléculaire pouvaient aboutir à la formation de motifs chimiques stationnaires spatialement auto-organisés [Turing 1952]. Il a également avancé que de tels processus pourraient bien être à l'origine de la morphogenèse dans les systèmes vivants.

La molécule activatrice de la réaction est auto-catalytique : elle permet sa propre formation ainsi que celle de son inhibiteur. La molécule inhibitrice, quant à elle, empêche l'auto-formation de l'activateur. La condition pour que ce système génère des motifs chimiques est que la vitesse de diffusion de l'inhibiteur soit plus élevée que celle de l'activateur. Dans ce cas, à partir d'une petite fluctuation de la concentration en activateur dans le milieu, un phénomène d'auto-amplification fait augmenter localement la concentration en activateur et, en conséquence, en inhibiteur. L'inhibiteur diffusant plus rapidement, il ne va pas empêcher l'auto-amplification de cette fluctuation en activateur de se faire, mais va par contre empêcher sa propagation. Un pic de concentration en activateur va apparaître progressivement, entouré d'une forte concentration en inhibiteur. Ce phénomène se répète un peu partout dans la solution et se transmet de proche en proche, aboutissant à la fin du processus de réaction-diffusion à un motif régulier constitué de pics d'activateur et de pics d'inhibiteur plus diffus (Figure 1) [Castet et al 1990, De Kepper and Dulos 1997]. Dans de tels systèmes de réaction-diffusion, la distance caractéristique entre les répétitions du motif (pics de concentration) est déterminée par le rapport entre la réactivité du système et la vitesse de diffusion des molécules. Nous verrons que c'est également le cas en ce qui concerne le motif microtubulaire strié.

Ce principe du couplage par réaction et diffusion peut très bien s'appliquer à des systèmes différents comme la dynamique de plusieurs espèces couplées (ex : lièvres et lynx). Pour la petite histoire, Turing cherchait initialement à expliquer les motifs de Fibonacci spiraux et réguliers dans les pommes de pin et plus généralement la morphogenèse dans le vivant [Andrew Hodges 1992]. Pour imager les réactifs chimiques de sa réaction, il avait associé les molécules à des cannibales (inhibiteurs, car se nourrissant de missionnaires) et à des missionnaires (activateurs) venus convertir les cannibales en nouveaux missionnaires [Communication privée (b)]. Turing avait assurément de l'humour, mais cela révèle aussi que, dans sa pensée, ce genre de système pouvait être généralisé dans la nature.

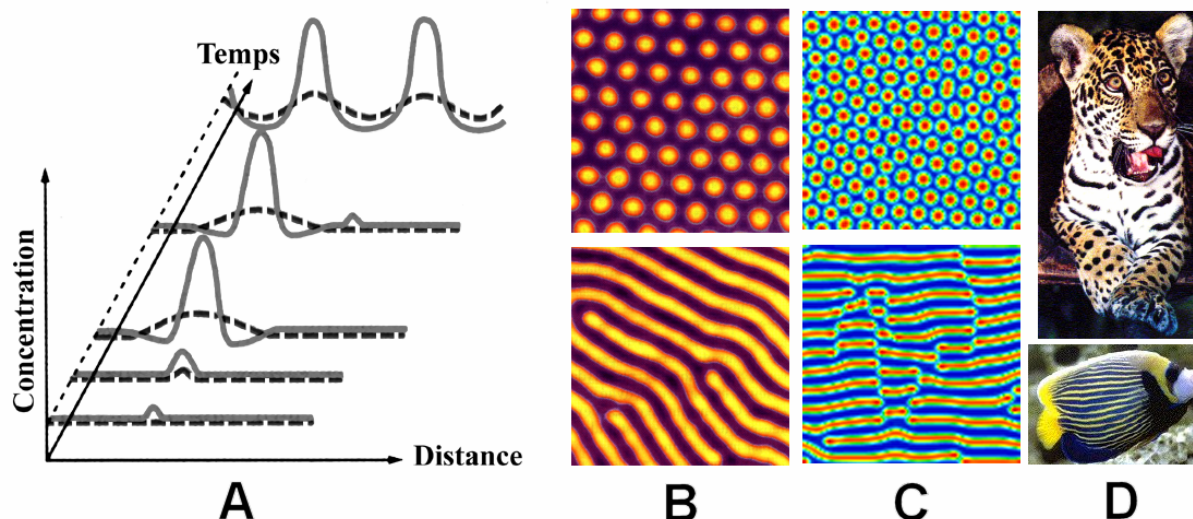


Figure 1. Le couplage par réaction et par diffusion de molécules activatrices et de molécules inhibitrices permet l'émergence spatiale de pics de concentration périodiquement répartis (D'après De Kepper et al 1998) (A). De telles structures peuvent effectivement apparaître dans ces réactions chimiques par des processus de réaction-diffusion (B). L'implémentation informatique du système de Turing permet de vérifier l'émergence d'un motif stationnaire formé de l'alternance périodique de pics de concentration. La figure montre le motif de concentration en activateur obtenu par simulation numérique (C). La formation de tels motifs sur le pelage des animaux pourrait être expliquée par ce type de système (ici, un jaguar de Guyane et un poisson ange *Pomacanthus imperator*) (D).

1.2.3. Les systèmes complexes ont des propriétés de bifurcation

L'existence de termes croisés dans la dynamique des systèmes complexes leur donne les propriétés d'un système ayant une dynamique non linéaire. En particulier, cela permet au système d'adopter des comportements asymptotiques très différents lorsqu'un des paramètres de la dynamique varie faiblement [May 1976]. Un comportement asymptotique correspond à l'état attracteur du système à un temps infini, c'est-à-dire l'état vers lequel le système tend irrémédiablement à se diriger durant son évolution. Les effets provoqués par une faible variation de l'état du système ne sont pas linéairement proportionnels à leur cause. Les cellules vivantes sont un bon exemple de systèmes qui peuvent répondre à une petite variation de leurs conditions environnementales par un brusque changement de comportement [Goldbeter 1990]. Les changements d'attitude des animaux (agressivité, stress, joie ...) en sont un autre [Thom and Zeeman 1974].

Dans certains de ces systèmes, leur éloignement par rapport à l'équilibre et leur non linéarité sont tels que le comportement qui en résulte est imprévisible : une infime variation

d'un des paramètres du système provoque des changements majeurs de son comportement. Ces systèmes, dits chaotiques, sont extrêmement sensibles aux conditions initiales : deux de ces systèmes possédant très exactement les mêmes caractéristiques, verront leur comportement diverger très rapidement [Bergé et al 1984, Gleick 1987, Stewart 1989, Bergé et al 1994]. L'exemple le plus connu est probablement celui du climat. Le climat est sans cesse changeant et une petite perturbation de celui-ci peut potentiellement provoquer un cataclysme climatique. C'est le fameux 'effet papillon'. C'est pour cette raison que le climat est difficilement prévisible par les modèles au-delà de quelques jours. Une infime différence entre le modèle climatique et la réalité s'amplifie dans la durée et fait complètement diverger les deux systèmes [Lorenz 1963].

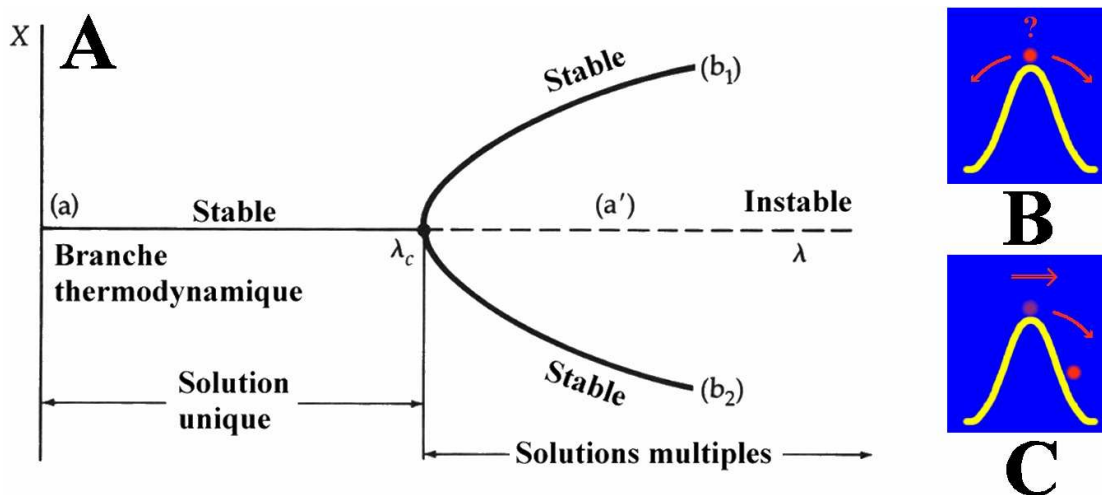


Figure 2. Ce schéma illustre le phénomène de bifurcation d'un système s'éloignant progressivement de l'équilibre thermodynamique avec la variation d'un paramètre λ (A). On suit l'état de ce système avec une de ses variables d'état, X . Au départ (a), le système est stable et à l'équilibre thermodynamique. Quand λ varie (de (a) vers (a')), le système s'éloigne progressivement de l'équilibre. Lorsque ce paramètre atteint une valeur critique λ_c , le système devient instable et il est alors sensible à de petites perturbations comme le serait une boule en équilibre instable sur une crête (B). Le moindre petit effet qui le perturbe le fait bifurquer vers l'un ou l'autre des états asymptotiques possibles (branches (b1) et (b2) du diagramme de bifurcation). D'une façon imagée, la boule instable tombe d'un côté ou de l'autre de la pente jusque dans la vallée où elle est stable à nouveau (C). Ainsi la symétrie du système est brisée et ce dernier évolue dans une voie privilégiée stable à nouveau. D'après Nicolis et Prigogine, 1989.

Ces systèmes, très sensibles aux petites variations de leurs conditions environnementales, sont pourvus de propriétés de bifurcation. Quand un système devient instable au cours de son évolution, il ne peut se maintenir dans cet état très longtemps. A ce moment d'instabilité, le système peut évoluer vers plusieurs états asymptotiques différents [Babloyantz 1986, Nicolis and Prigogine 1989]. La moindre perturbation du système le contraint à bifurquer vers un de ces états asymptotiques. La figure 2 est un diagramme de bifurcation illustrant la bifurcation bistable à laquelle est soumis un système dynamique dont on fait varier un des paramètres.

Une bonne image de ceci est celle d'un skieur descendant d'une montagne le long d'une crête. Il est sans cesse en mouvement, mais il est dans une situation instable dans laquelle la moindre perturbation (une bosse, un coup de vent ...) peut le faire bifurquer vers l'un ou l'autre côté de la montagne. En biologie, le système immunitaire lui-même, pris dans son ensemble, est un excellent exemple de système pouvant adopter différents types de comportements asymptotiques dans l'organisme [Perelson and Weisbuch, 1997]. Un exemple évident de bifurcation dans le système immunitaire est sa différenciation (par exemple la différenciation des lymphocytes T en CD4+ et CD8+). Également, dans certaines infections, à partir d'un même agent infectieux le système immunitaire peut répondre de plusieurs façons différentes. Un bon exemple est celui de la lèpre (infection par *Mycobacterium leprae*) qui peut se déclarer sous deux formes complètement différentes : la lèpre lépromateuse (réponse hypersensible), grave et difficile à guérir, et la lèpre tuberculoïde (réponse humorale) qu'on peut facilement soigner avec des antibiotiques [Page Faulk and Greenwood 1977, Harboe and Closs 1980].

1.2.4. Ces systèmes sont sensibles aux champs externes

Parmi les perturbations qui peuvent influencer sur le devenir d'un système au point de bifurcation, il y a entre autres les champs externes faibles, tels que la gravité ou des champs magnétiques. Dans le cas particulier des systèmes de réaction-diffusion, Kondepudi et Prigogine ont calculé que la gravité pouvait permettre à un système de bifurquer lorsque l'effet de l'interaction entre le champ externe faible et ce système est supérieur à celui qui est dû à l'agitation thermique des molécules qui le constituent [Kondepudi and Prigogine 1981, Kondepudi 1982, Kondepudi and Prigogine 1983]. Dans un système chimique éloigné de l'équilibre thermodynamique, des fluctuations de densité dues aux réactifs peuvent apparaître dans la solution du fait de phénomènes d'auto-amplification dus au couplage des espèces

réactives en solution. C'est le cas dans le système imaginé par A. Turing. Dans ces systèmes, la gravité agit parce que l'interaction de la force gravitationnelle avec les fluctuations de densité est supérieure à l'agitation thermique qui règne dans le système ; autrement dit, l'énergie d'interaction ' E_{int} ' est supérieure au produit de la constante de Boltzmann par la température ($E_{\text{int}} > kT$). Si cela est le cas, alors le système peut bifurquer vers l'une ou l'autre des morphologies vers lesquelles le système peut se diriger. C'est le cas des solutions auto-organisées de microtubules qui peuvent bifurquer entre plusieurs morphologies au moment où la solution est chimiquement instable, au début du processus de réaction-diffusion.

1.2.5. De leur dynamique peuvent émerger de nouvelles propriétés

Une des particularités des systèmes complexes est que, de leurs dynamiques peuvent émerger de nouvelles propriétés qui ne sont celles d'aucun des constituants du système pris indépendamment. Elles résultent en fait du comportement de l'ensemble de ses constituants.

La génération d'ordre et de formes est une des propriétés émergentes des systèmes dynamiques. Mais ceux-ci peuvent également montrer d'autres types de comportements. Au lieu d'un ordre spatial, c'est un 'ordre temporel' qui peut apparaître. Ils peuvent osciller dans le temps et même montrer un comportement irrégulier d'aspect stochastique, bien que purement déterministe. Ce comportement est nommé chaos. Le chaos contient lui-même un ordre caché important [Gleick 1987].

L'émergence de comportements oscillant périodiquement, d'ordre et de formes dans les systèmes complexes ne se fait pas dans les systèmes chaotiques, mais plutôt au voisinage du chaos [Prigogine and Stenger 1984, Coveney and Highfield 1995]. Le choix entre les différents états asymptotiques possibles, appelés également attracteurs, se fait aux frontières d'instabilité du système dans son espace d'état. C'est à ce moment que des perturbations externes peuvent le faire bifurquer vers l'un ou l'autre des états asymptotiques possibles.

La façon dont l'ordre et les formes émergent dans ces systèmes n'est pas particulièrement liée à la nature des éléments qui les constituent. Comment, en effet, expliquer le fait que l'on retrouve, dans des systèmes aussi différents que des colonies d'animaux ou d'organismes unicellulaires, dans des réactions chimiques comme la réaction de Belousov-Zhabotinski ou la réaction de Briggs-Rauscher, ou dans des mouvements turbulents comme ceux de l'atmosphère, un niveau d'ordre et des motifs comparables ? De même, les comportements oscillants dans les systèmes complexes sont observés aussi bien dans les réactions chimiques oscillantes, que dans les dynamiques de populations (insectes, systèmes

proies-prédateurs, microtubules). Ce sont davantage les règles de fonctionnement du système qui dictent la façon dont cela se fait, c'est-à-dire l'activité propre des éléments du système et la façon dont ces derniers communiquent entre eux. De plus, ce n'est pas en connaissant en détail les constituants d'un système (molécule, animal, cellule...) que l'on peut expliquer comment le système fonctionne. La connaissance d'une molécule d'eau ne renseigne pas sur la formation d'un vortex. Ce que l'on doit comprendre, c'est la façon dont les constituants du système coopèrent entre eux, se concertent pour s'ordonner entre eux et donner à l'ensemble un comportement collectif cohérent.

2. Importance des systèmes complexes dans le vivant

La génération spontanée d'ordre et de formes est l'une des caractéristiques essentielles des systèmes vivants. Dans le système de Turing, les motifs stationnaires tachetés de la concentration en réactifs émergent progressivement par réaction et diffusion. De nombreux théoriciens ont fait l'analogie entre ces structures de Turing et les motifs répétitifs observés chez les animaux. Ces motifs sont des motifs de pigmentation, comme par exemple les rayures des zèbres ou les fameuses taches du léopard (Figure 1), ou bien des motifs génétiques, notamment ceux des gènes de segmentation des insectes. De même, les réactions oscillantes sont à rapprocher des oscillations périodiques fréquemment observées dans la nature. Ces sujets ont inspiré l'élaboration de nombreux modèles reposant souvent sur des équations de réaction-diffusion telles que Turing les avait décrites. Ces modèles font intervenir la coexistence de boucles d'activation et de boucles d'inhibition couplées entre elles.

Générer spontanément de l'ordre et des formes représente un avantage considérable dans la nature. L'obtention de motifs et de structures auto-organisés demande au système vivant de ne stocker que très peu d'information, en comparaison de la quantité d'information génétique équivalente qu'il faudrait pour générer la même quantité d'ordre. C'est d'ailleurs un des principaux arguments justifiant l'importance de ces processus dans le vivant. En outre, nous avons vu que ces derniers permettent l'obtention de nombreux états asymptotiques différents à moindre frais. Toutes les cellules d'un organisme possèdent le même capital génétique, cependant elles existent sous de très nombreuses formes différentes. Ceci peut être vu comme autant d'états asymptotiques différents obtenus à partir d'un même système placé dans des conditions environnementales différentes à des moments précis au cours du développement. La différenciation des différents types cellulaires pourrait être représentée

comme une suite de bifurcations sous l'effet de modifications environnementales et même de champs externes faibles comme la gravité.

Les systèmes complexes, lorsqu'ils adoptent un état asymptotique, comme par exemple la morphologie tachetée d'un système de Turing, conservent leur morphologie, même lorsqu'on les perturbe légèrement par de petites variations. Par exemple, si l'on ajoute un peu d'activateur ou d'inhibiteur en un point de la structure déjà formée, la solution perturbée va peu à peu absorber la variation et rejoindre l'état asymptotique stationnaire qu'elle avait avant. Cela permet au système de maintenir son état organisé et de se réparer en cas de modification due à une perturbation extérieure au système. C'est l'homéostasie des systèmes vivants. Si l'on détruit une fourmilière en remuant la terre, celle-ci va peu à peu se reconstruire grâce à la colonie de fourmis pour reprendre un aspect semblable. La cicatrisation d'une plaie ou la récupération d'un organisme suite à une maladie sont des phénomènes du même acabit. De plus, la fourmilière, une fois formée, évolue peu malgré les échanges importants d'énergie (matériel et nourriture) qui se font pour sa maintenance ; elle garde ainsi son aspect dans le temps. Elle est dans un état organisé stationnaire.

Enfin, point qui nous intéresse particulièrement, la sensibilité de certains systèmes complexes aux champs externes faibles pourrait suffire à expliquer la sensibilité des êtres vivants vis-à-vis de la gravité ou d'autres champs comme les champs magnétiques ou les champs électromagnétiques.

3. Exemples de systèmes dynamiques

Les systèmes complexes sont très variés dans la nature. Après en avoir explicité les principales propriétés, il est intéressant d'en étudier quelques-uns parmi les plus typiques. Nous avons en effet dit que leur compréhension passe souvent par de multiples analogies avec d'autres mieux connus. C'est autant d'exemples qui nous ont servi de base de réflexion pour les processus auxquels nous nous sommes intéressés.

3.1. Des motifs stationnaires peuvent se former dans les fluides en mouvement

Dans les fluides en mouvement, des motifs hydrodynamiques peuvent apparaître. Deux expériences illustrent cet aspect de l'auto-organisation.

L'instabilité de Taylor-Couette est un motif hydrodynamique strié obtenu quand on met en rotation turbulente un fluide entre deux cylindres. Un fluide est placé dans l'espace

contenu entre deux cylindres concentriques. Le cylindre externe reste fixe tandis que le cylindre interne tourne à vitesse constante. Pour une certaine valeur critique de la vitesse de rotation, une répétition de bandes horizontales superposées et stationnaires apparaît dans le fluide [Taylor 1923, Koschmieder and Pallos 1974] (Figure 3). Lorsque la vitesse de rotation est augmentée, on assiste à des dédoublements successifs des bandes de fluide, puis, à partir d'une certaine valeur de la vitesse de rotation, ces bandes disparaissent pour ne laisser place qu'à un mouvement turbulent chaotique [Swinney and Gollub 1978].

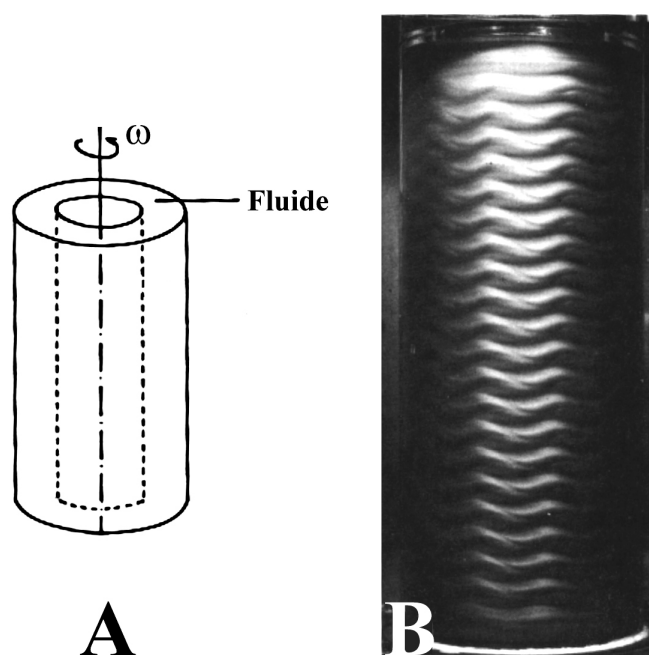


Figure 3. *Instabilité de Taylor-Couette. Des stries apparaissent dans un liquide visqueux maintenu entre deux cylindres en rotation (Schéma A). Ces couches de fluide apparaissent lorsque la vitesse de rotation du cylindre interne atteint une valeur critique (B). Les couches de fluides sont rendues visibles par addition de poudre d'aluminium dans le fluide (d'après Koschmieder and Pallos 1974). Elles peuvent aussi être visualisées par doppler Laser (Swinney and Gollub 1978).*

Les cellules de convection de Bénard [Bénard 1900, Rayleigh 1916, Velarde and Normand 1980] sont obtenues en plaçant un liquide visqueux entre deux plaques planes espacées d'un millimètre et en chauffant ces deux plaques à deux températures constantes et uniformes telles que la température de la plaque du bas soit plus élevée que celle de la plaque du haut. Quand la variation de température entre ces deux plaques atteint une valeur critique, des rouleaux de convection apparaissent, disposés régulièrement dans tout le plan de liquide entre les plaques (Figure 4). Les mouvements de convection transfèrent le fluide de la couche

chaude en bas vers la couche plus froide selon un mouvement de rotation du liquide. C'est un processus analogue qui se produit lors de la formation des cyclones dans l'atmosphère terrestre.

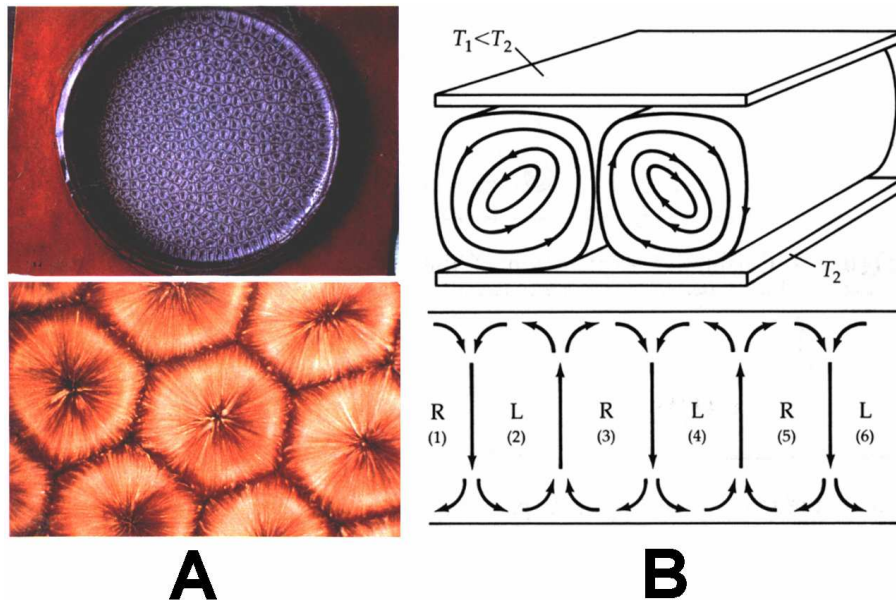


Figure 4. Photographies des rouleaux de convection de Bénard (A) et leur représentation schématique (B). Des cellules hexagonales se forment par convection dans une couche d'huile de silicone de 1 mm d'épaisseur (d'après Coveney and Highfield 1990)(A, bas). Schéma(B) d'après Babloyantz, 1986.

Il existe encore beaucoup d'autres motifs stationnaires de type hydrodynamique, par exemple les tourbillons dans l'eau. Il suffit de se pencher du haut d'un pont de l'Isère (ou de n'importe quelle autre rivière) pour y apercevoir des chapelets de tourbillons en rotation sur eux-mêmes, mais dont la position absolue ne varie quasiment pas. La fameuse tache rouge de la planète Jupiter est un des nombreux tourbillons stationnaires qui se forment dans son atmosphère turbulente.

Quels sont les enseignements que nous pouvons tirer de telles observations ? Eh bien tout d'abord, ces phénomènes illustrent la nécessité de la dissipation d'énergie pour obtenir des motifs stationnaires. Dans le cas des cellules de Bénard, l'énergie est consommée en chauffant les plaques et, pour l'instabilité de Taylor-Couette, il s'agit d'une conversion en énergie mécanique (frottement). Si l'on arrête de fournir de l'énergie à ces systèmes, les motifs disparaissent. Le deuxième point important est que l'obtention de ces motifs ne peut être comprise en termes de molécules individuelles et en ne se référant qu'aux propriétés intrinsèques des constituants du système.

3.2. Les systèmes de réaction-diffusion classiques : les réactions BZ et CIMA

Comme Turing l'avait prédit en 1952, des systèmes chimiques sont capables de s'auto-organiser par des réactions couplées à des processus de transport. Les réactions de ce type les plus connues sont les réactions de Belousov-Zhabotinski (BZ) [Belousov 1951, 1958, Zhabotinski 1967] et de Briggs-Rauscher et ses variations (CIMA) [Castets et al 1990, Ouyang and Swinney 1991]. Ce sont des réactions oscillantes qui, dans certaines conditions, peuvent aboutir à la formation de motifs chimiques stationnaires de concentration des réactifs.

Les réactions oscillantes ne sont pas complètement inconnues [Bray 1921, Lotka 1910] quand le russe B. P. Belousov découvre, en 1951, que la réaction d'oxydation de l'acide citrique par du bromate de potassium, catalysée par des ions cérium (Ce^{3+}) qui jouent également un rôle d'indicateurs colorés, présente des oscillations temporelles périodiques. Belousov a mesuré ces oscillations par spectrophotométrie. En laboratoire, on peut voir que la solution alterne périodiquement d'un aspect transparent (ion Ce^{3+}) à un aspect coloré au jaune pâle (ions Ce^{4+}). A l'époque, son travail n'a pas été accepté car cette réaction est jugée impossible. Belousov ne parvient à publier qu'en 1958 dans un compte rendu d'un obscur congrès de radiobiologie n'ayant aucun rapport avec son travail. Quelques années plus tard, en 1964, un autre physicien russe, A. M. Zhabotinski confirme cette expérience et la modifie un peu en remplaçant l'acide citrique par de l'acide malonique (une molécule très proche) et en ajoutant un colorant. La réaction présente cette fois des alternances rouges et bleues. Durant toute la réaction, l'acide malonique est consommé et il se forme de l'acide bromo-malonique, du CO_2 gazeux et de l'eau.

Placée en fine couche dans une boîte de Pétri, la solution oscille toujours dans le temps, mais cette fois apparaît en plus un motif spatial. Des ondes colorées se déplacent rapidement dans la boîte : ces ondes se forment en plusieurs points dans la boîte, traversent l'échantillon de part en part à des vitesses de plusieurs millimètres par seconde et se terminent sur les parois du conteneur. Placée dans un tube à essais fermé, la solution oscillante fini par se stabiliser et un motif stationnaire strié apparaît. Le motif est constitué d'une alternance de stries rouges séparées par une fine couche bleue. Une autre réaction d'oxydoréduction, la réaction CIMA, effectuée dans un gel permet d'obtenir différents motifs stationnaires et constitue une preuve que cette réaction est telle que Turing l'avait prédite (le gel permet de s'assurer que les différents réactifs de la solution ont des vitesses de diffusion différentes,

comme cela est requis dans le système de Turing). La figure suivante montre différents motifs obtenus avec cette réaction (Figure 5).

Dans le titre de cette section, nous avons qualifié ces systèmes de réaction-diffusion de l'adjectif 'classiques'. Classique ne signifie pas que c'est une réaction banale. En fait, il s'agit juste de signaler qu'il existe d'autres types de systèmes de réaction-diffusion, qui, s'ils intègrent tous les aspects des systèmes de Turing, ont en plus certaines caractéristiques particulières. C'est le cas de certains systèmes collectifs comme les colonies de fourmis ou les populations de microtubules. Dans ces deux exemples il existe une anisotropie spatiale dans la réaction comme nous le verrons par la suite.

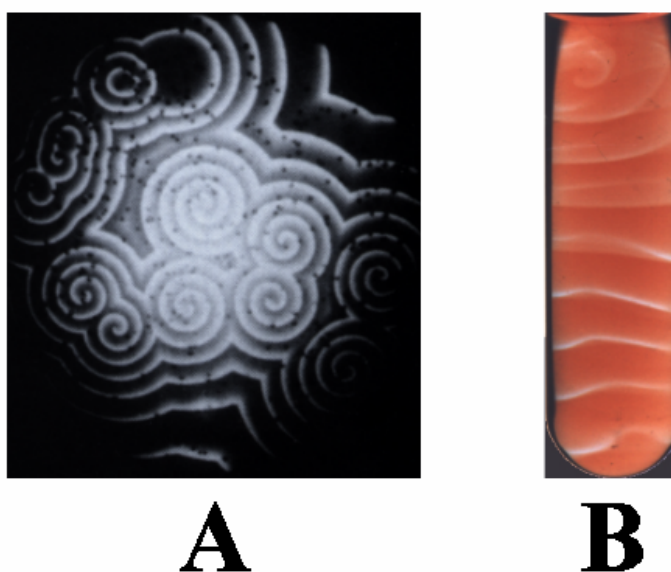


Figure 5. *Des vagues concentriques ou spirales se déplacent à vive allure quand la réaction de Belousov-Zhabotinski est réalisée dans une boîte de Pétri (A). Dans un tube à essai, des bandes horizontales stationnaires apparaissent progressivement à partir d'une solution homogène (B).*

3.3. Les systèmes collectifs

Les colonies de fourmis, les essaims de guêpes et d'abeilles, les bancs de poissons, les nuées d'oiseaux ou de chauves souris, les populations de lucioles ou de criquets au crépuscule, les motifs extraordinaires formés par des colonies de bactéries, d'amibes *Dictyostelium discoideum* ou encore par une population de microtubules, sont autant d'exemples illustrant comment des systèmes constitués d'un grand nombre fini d'individus ayant chacun leur propre

activité, mais communiquant avec leurs congénères, s'auto-organisent pour former des motifs spatio-temporels.

Rares sont ceux qui n'ont jamais observé ce genre de formation. Buffon écrit "*ils [les animaux] sont même portés par la nature à demeurer ensemble, à se réunir en familles, à former des espèces de sociétés. [...] On y voit même des ouvrages faits en commun, des espèces de projets, qui, sans être raisonnés, paraissent être fondés sur des convenances raisonnables, dont l'exécution suppose au moins l'accord, l'union et le concours de ceux qui s'en occupent*" [Buffon (d)]. Dans ces groupes constitués d'un grand nombre d'individus, apparaissent en effet des structures ou des organisations tout à fait complexes, comme par exemple des nids et des réseaux de galeries très structurés chez les insectes sociaux, ou encore, chez d'autres espèces, des formations de bancs ou de nuées très organisées, de formes particulières et parfois caractéristiques (boules, tubes, spirales). Dans les systèmes collectifs, chaque individu ne connaît pas, et n'a aucunement besoin de connaître le plan des structures à former. Par exemple, les fourmis ne connaissent pas le plan de leur fourmilière, ni avant, ni après qu'elle soit construite. De plus, ce n'est pas parce qu'on comprend comment marche ou se nourrit chaque fourmi d'une colonie qu'on peut comprendre comment elles cherchent leur nourriture ou s'organisent entre elles pour faire émerger des structures et de nouvelles propriétés dans la colonie. C'est de la somme des actions individuelles et de la communication entre les individus qu'émergent ces structures et de nouvelles propriétés associées non pas à chaque individu indépendamment, mais à la collectivité toute entière.

En fait, ce type de comportement se retrouve dans tous les systèmes collectifs, chacun d'entre eux ayant ses spécificités liées à l'activité, au mode et à la vitesse de communication des individus qui les composent.

Il existe de très nombreux systèmes collectifs aisément observables dans la nature. Ceux-ci peuvent avoir un nombre très important d'entités (il existe des termitières géantes comportant des milliards de termites), et des individus de taille variables allant des plus grands (animaux), aux plus petits (bactéries, amibes, molécules).

Il est particulièrement frappant de retrouver souvent des formations de même type dans des systèmes pourtant très différents. Par exemple, la forme spirale s'observe au cours du vol des colonies de chauves-souris du Nouveau-Mexique, dans le cycle de l'amibe *Dictyostelium discoideum* [Bonner 1967] et dans certaines formes d'organisation microtubulaire [Harris and Clason 1992]. Dans les bancs de poissons [Parrish and Edelstein-Keshet 1999], les nuées d'oiseaux migrateurs en train de se rassembler ou les rassemblements de fourmis guerrières [Deneubourg and Goss 1989], on remarque assez fréquemment une

formation en tube ou en tore. Quant à la forme striée, elle découle la plupart du temps de l'effet d'une perturbation externe sur le système collectif, suffisante pour induire un biais directionnel dans les actions individuelles des éléments du système. Un nid d'insectes sociaux peut en effet avoir une structure striée, s'il est exposé durant sa construction à un flux directionnel d'air. Les stries qui se forment sont alors perpendiculaires à la direction de la perturbation. Remarquons que ce type de morphologies spatio-temporelles est également fréquent dans les systèmes de type 'Turing' (spiraies et stries dans la réaction de Belousov-Zhabotinski).

Les microtubules suivent ce type de comportement collectif pour s'auto-organiser. D'ailleurs, en partant du principe que les microtubules s'auto-organisent par des processus collectifs, il est amusant de constater qu'on peut aisément remplacer le mot 'fourmi' par le mot 'microtubule' dans les textes traitant de l'auto-organisation des colonies de fourmis [ex: Theraulaz et al, 1998]. Il est donc intéressant pour nous de constater que de tels processus ont lieu à des échelles aussi diverses et dans des systèmes aussi différents que des colonies de fourmis, des populations de microtubules ou encore des amibes sociales.

Un tel parallèle est très instructif, car, indépendamment du système étudié, on retrouve les mêmes mécanismes et les mêmes propriétés émergentes. En outre, dans tous ces systèmes, la taille des structures qui se forment est sans commune mesure avec celle des individus qui la composent : les stries de microtubules sont beaucoup plus grandes que les microtubules, un termite est insignifiant dans la termitière et, quand on regarde une nuée d'oiseaux il est impossible de suivre un oiseau en particulier.

Le cas de l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* permet de bien comprendre comment, à partir de la simple mise en place d'une communication entre les cellules individuelles, vont apparaître des motifs spiralés puis un pseudo-organisme pluricellulaire.

C'est cependant l'exemple des sociétés d'insectes, comme les fourmis ou les abeilles, qui s'approche le plus de notre problématique.

3.3.1. L'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum est un organisme vivant la plupart du temps sous forme unicellulaire. Pourtant, quand sa source de nourriture (des bactéries) vient à manquer, cette amibe adopte un tout autre mode de vie ; elle devient pluricellulaire. Le cycle complexe qui l'amène du stade unicellulaire jusqu'à la fructification dure environ huit heures et fait intervenir des processus collectifs de réaction-diffusion dans la population d'amibes. Ces

processus impliquent la production d'une petite molécule, l'AMPc (Acide Monophosphate cyclique) assurant la communication entre les amibes par diffusion moléculaire.

Le cycle de cette amibe [Bonner 1967] est grossièrement découpé en quatre phases. La majeure partie du temps, *D. discoideum* dispose de suffisamment de nourriture. L'amibe se multiplie pendant cette phase de croissance. La population d'amibes n'existe alors pas encore en tant que système collectif. C'est un stade unicellulaire. En l'absence de nourriture, les cellules changent de comportement. On entre en phase d'agrégation, durant laquelle les amibes se rassemblent pour former un amas. Elle est suivie d'une phase de migration de l'amas sous la forme d'un limaçon, et, enfin, d'une phase de culmination, qui aboutit à la formation de spores soutenues par une tige de cellules mortes.

La phase d'agrégation constitue un bon exemple montrant comment, partant d'une population de cellules individuelles communiquant entre elles, apparaissent des motifs cellulaires organisés et des propriétés collectives émergentes. Au départ, les amibes sont réparties de façon homogène dans le milieu. Quand le manque de nourriture se fait sentir, Les amibes cessent de se multiplier et commencent à émettre dans le milieu environnant de l'AMPc [Konijn et al 1967, Barkley 1969]. Cette molécule va agir principalement de deux façons. D'une part, elle va auto-réguler l'activité de la cellule émettrice, ce qui provoque une émission de type pulsatile. D'autre part, en diffusant dans le milieu environnant, elle assure la communication intercellulaire en régulant l'activité des cellules voisines, ce qui va permettre la synchronisation spatio-temporelle de la population. Très rapidement, certaines cellules, plus en avance que le reste de la colonie dans l'émission d'AMPc, deviennent des centres pulsateurs d'AMPc. L'émission périodique de l'AMPc à partir de ces quelques centres, génère des ondes concentriques d'activité des amibes voisines. Les amibes activées vont, d'une part, migrer par chimiotactisme vers le centre de l'amas en train de se former et vers les zones de relais, et, d'autre part, servir elles-mêmes de relais en émettant à leur tour et de façon synchrone de l'AMPc. Peu à peu, les amibes vont se disposer en cercles concentriques autour du centre pulsateur. L'onde concentrique se déforme progressivement en onde spirale partant du centre (Figure 6), et les amibes se rassemblent de plus en plus au centre de l'amas. C'est à partir de ce moment, quand l'amas à atteint une certaine taille, que commence la phase de migration de l'amas sous la forme d'un limaçon. Ce motif auto-organisé est à rapprocher des ondes spirales qui se forment dans la réaction de Belousov-Zhabotinski et des ondes de concentration en microtubules [Mandelkowitz et al 1989].

Par la suite, il a été montré que le déplacement du limaçon, ainsi que sa culmination pour former les spores et la tige, sont également contrôlés par des pulsations d'ondes spirales d'AMPC depuis l'avant vers l'arrière de la colonie.

Plusieurs modèles, fondés sur ce processus de réaction-diffusion, parviennent à reproduire le comportement d'agrégation [Cohen and Robertson 1971, Martiel and Goldbeter 1987, Tyson et al 1989], mais également la migration et la culmination.

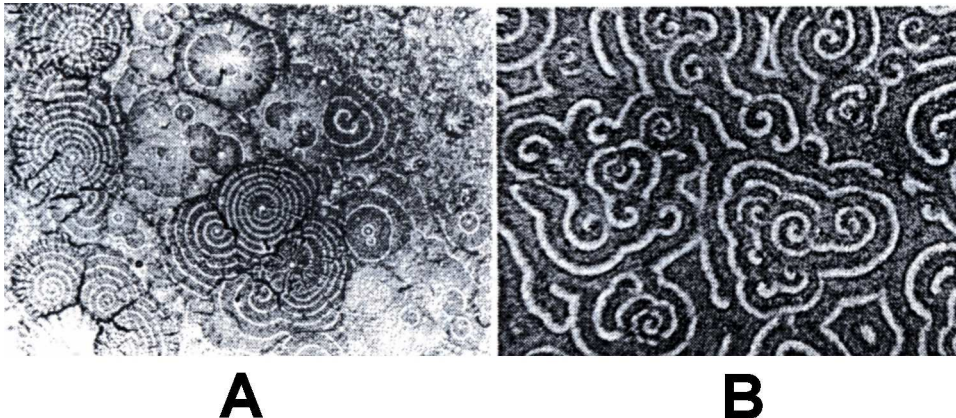


Figure 6. Motifs d'ondes concentriques et spirales se formant au cours du cycle de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (d'après Newell 1983). (A) Motifs formés par la répartition des amibes ; (B) Motifs d'AMPC émis par les amibes.

3.3.2. Les insectes sociaux. L'exemple des fourmis et des termites

Sans réécrire un nouveau chapitre sur le comportement de ces insectes, la littérature étant déjà bien fournie et plus détaillée, nous avons jugé intéressant de décrire quelques aspects caractéristiques de leur organisation en société et de leurs constructions.

L'observation plus facile du comportement des insectes sociaux (on peut étiqueter chaque individu avec un numéro) est en effet un bon moyen pour appréhender les mécanismes mis en œuvre dans l'élaboration de structures complexes, ainsi que les propriétés émergentes des actions de la collectivité. Ces sociétés d'insectes, les hyménoptères (fourmis, guêpes, abeilles et bourdons) et les isoptères (termites), constituent un excellent modèle de systèmes collectifs. Les sociétés de fourmis constituent un excellent exemple de système collectif. Ce système est particulièrement intéressant pour nous car, comme nous le verrons plus tard, la façon dont s'auto-organisent les fourmis est très proche de la façon dont s'auto-organisent les microtubules dans notre modèle.

Soulignons tout d'abord que le comportement social de ces insectes leur assure une excellente adaptabilité, donc une capacité à survivre impressionnante, puisqu'ils existent depuis plus de 100 millions d'années et ont colonisé toute la planète jusqu'aux milieux les plus extrêmes. Ils constituent ainsi 20% de la biomasse animale et 75% de la masse totale d'insectes [Hölldobler and Wilson 1991]. Une seule colonie de fourmi ou de termite peut comporter plusieurs milliards d'individus. Les colonies géantes de fourmis peuvent s'étendre sur plusieurs kilomètres et les termitières géantes peuvent atteindre une dizaine de mètres de hauteur. Ce sont des échafaudages gigantesques par rapport à la petitesse de leurs architectes.

Bien que le fonctionnement de ces sociétés soit extrêmement simple au niveau individuel, les comportements et les structures qui en émergent sont toutefois d'une grande complexité. Cette complexité provient essentiellement de deux aspects. Tout d'abord, elle est la résultante de l'ensemble des actions d'individus couplés entre eux par une forme de communication (chimique, visuelle, sonore...). Pour rapprocher ceci d'un système de Turing, on peut dire que la réaction est représentée par l'activité individuelle de chacune des fourmis et que la diffusion est représentée par la diffusion moléculaire de substances chimiques et par le déplacement des fourmis. Deuxièmement, les premières formes organisées apparaissant du fait de ce processus (ex : apparition des premières structures d'un nid) induisent elles-mêmes un contrôle sur le devenir de la colonie. Les travaux que va effectuer un insecte vont guider son activité future. C'est ce que l'on appelle la stigmergie [Grassé 1959].

Quand une fourmi se déplace, elle dépose derrière elle une traînée de phéromones attractives marquant ainsi son chemin. Ce sont en effet principalement grâce à ces molécules odorantes, les phéromones, que les fourmis dialoguent entre elles. Elles peuvent être de deux types, soit attractives, auquel cas les fourmis voisines se dirigent vers la source de phéromones, et, inversement, elles peuvent être répulsives.

Une fourmi arrivant, au gré de ses déplacements, sur la trace laissée par une autre fourmi, aura tendance à changer son chemin et à suivre ce nouveau chemin. De plus, les phéromones vont diffuser depuis la trace. Ainsi, des fourmis, même distantes, vont pouvoir "sentir" ces phéromones et dévier de leur route pour suivre le chemin laissé par cette fourmi. En outre, les fourmis qui suivent ce nouveau chemin vont le renforcer, car elles vont elles-mêmes déposer leurs propres phéromones [Hölldobler and Wilson 1991]. C'est cette auto-amplification qui permet la génération des structures auto-organisées dans ces sociétés

d'insectes, sans que celles-ci aient un quelconque plan architectural dans la tête. Une altération de la communication entre les fourmis désorganise complètement la colonie. On peut tester cela en utilisant une molécule qui détruit les phéromones, comme le font certains insecticides.

Comme conséquence de ce processus, on va voir apparaître des chemins préférentiels suivis par les fourmis : c'est les colonnes de fourmis que l'on observe souvent dans la nature et aussi trop souvent dans les cuisines (Figure 7).

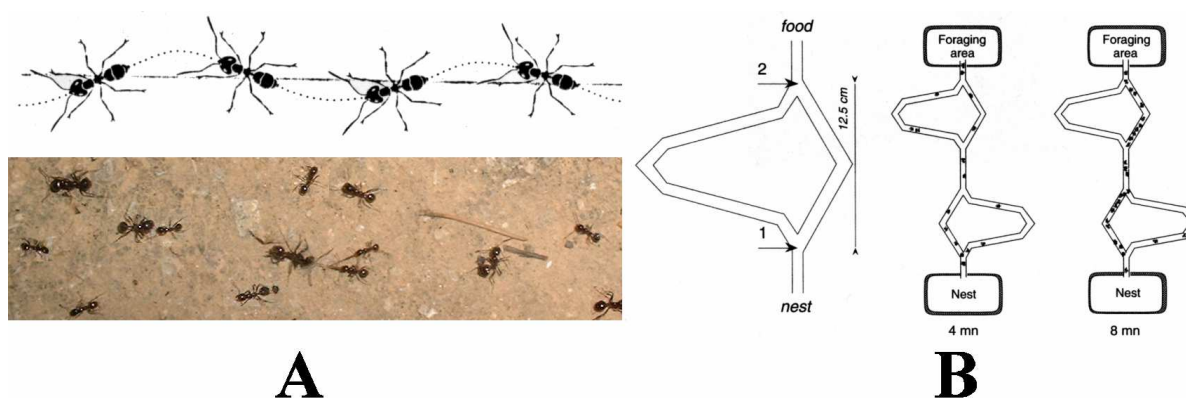


Figure 7. Les fourmis s'auto-organisent souvent en colonnes car chaque fourmi libère derrière elle des phéromones qui indiquent un chemin préférentiel aux autres fourmis. Ces dernières renforcent le chemin qui se forme en libérant, elles aussi, des phéromones. Cette trace se renforce et une colonne se forme progressivement par des processus collectifs (A). Lorsqu'il y a deux chemins menant à une source de nourriture, l'un plus long que l'autre, le plus court chemin émerge de la collectivité (B).

Celles-ci en tirent un bénéfice, notamment pour la recherche de nourriture. Plusieurs expériences en laboratoire et des modèles informatiques ont démontré que la colonie déterminait ainsi le plus court chemin entre les sources de nourriture et le nid [Goss et al 1989, Beckers et al 1992, Bonabeau et al 1999, Deneubourg and Goss 1989]. L'expérience consiste à disposer une source de nourriture à proximité d'une fourmilière. Pour y accéder, il existe deux chemins, dont l'un est plus court que l'autre. Au départ, les fourmis cherchent au hasard la nourriture par l'un ou l'autre des deux chemins. Quand une fourmi rencontre la source de nourriture, elle revient au nid en déposant derrière elle des phéromones afin d'en marquer le chemin. Les autres fourmis, vont petit à petit suivre cette trace entre le nid et la source de nourriture, au lieu de marcher au hasard et la renforcer. On s'aperçoit que c'est toujours le chemin le plus court qui est privilégié. En effet, le nombre d'allers-retours étant

plus élevé quand on prend le chemin le plus court, la trace de molécules qui lui correspond sera d'autant plus vite renforcée par rapport à celle de l'autre chemin. On comprend aisément que ce système sélectionnant les plus courts chemins permet une grande économie d'énergie à la colonie toute entière pendant la recherche de nourriture notamment.

Suivant le même processus, des propriétés de bifurcation peuvent spontanément apparaître [Goss et al 1989, Beckers et al 1992, Bonabeau et al 1999, Deneubourg and Goss 1989]. Cette fois, on dispose deux sources de nourriture à distance égale de la fourmilière. On s'aperçoit qu'après mise en place du réseau de fourmis, seule une des deux sources est utilisée, même si leur distance au nid est équivalente. En fait, au départ, les fourmis cherchent au hasard et aboutissent sur l'une ou l'autre des deux sources de nourriture. S'il y a le même nombre de fourmis dans les deux voies, le système sera à l'équilibre. Il suffit d'une fourmi de plus d'un côté pour faire basculer le choix de la colonie sur une seule des deux voies. Cette fourmi supplémentaire augmente l'intensité de la trace dans sa voie. A partir de ce moment, les fourmis au départ du nid auront une légère tendance à aller davantage dans cette voie renforcée. Ainsi, le processus s'auto-amplifie jusqu'à ce que toutes les fourmis choisissent cette voie.

Enfin, l'auto-amplification joue un rôle essentiel dans la survie et la détermination des plus courts chemins en milieux hostiles. Considérons par exemple qu'il existe dans l'environnement des sources de nourriture comestible et une source de nourriture empoisonnée. Si une fourmi se dirige vers cette dernière, elle meurt empoisonnée et ne revient pas. Dans ce cas, aucune trace de molécules attractives ne sera déposée sur son trajet de retour. Sauf par hasard, les autres fourmis ne se dirigeront pas vers cette source empoisonnée, donc aucun renforcement de ce trajet ne se fera, contrairement aux trajets menant aux sources de nourriture comestible. C'est un mécanisme de recherche des zones favorables que nous retrouvons dans notre modèle de microtubules.

La formation des fourmilières repose sur ce même principe d'auto-amplification. En plus de ce processus local de communication chimique entre les fourmis, il faut un biais global s'appliquant à l'ensemble de la colonie pour synchroniser dans le temps et dans l'espace les actions de tous les individus. Chez les fourmis, c'est la reine qui remplit cette fonction en émettant, lors de la formation du nid, des phéromones qui diffusent tout autour d'elle. Seule une fourchette étroite de concentration en phéromones (ni trop, ni trop peu) convient aux ouvrières. C'est seulement quand elles se trouvent dans une région contenant la concentration idoine que celles-ci construisent. Cela détermine ainsi la forme du nid.

S'il n'y a aucun obstacle autour de la reine, la diffusion est uniforme dans toutes les directions. La base du nid aura ainsi une forme parfaitement circulaire. C'est cependant rarement le cas ; dès qu'un obstacle est présent ou bien apparaît durant la construction, alors cela modifie le profil de diffusion des phéromones émises par la reine, donc la forme du nid. D'autres effets extérieurs, même faibles, ont une conséquence sur la structure finale de la fourmilière. Les courants d'air, les gradients de température, la topologie du terrain initial sont autant d'effets externes qui biaisent la construction du nid. C'est l'ensemble de ces facteurs induisant un biais global que l'on nomme le "gabarit" [Chauvin 1959].

Durant la construction du nid, on constate donc plusieurs choses. Tout d'abord, l'apparition des structures est liée aux activités collectives des fourmis. Ces structures se forment grâce à un processus d'auto-amplification. Le fait même de construire modifie l'aspect du profil de diffusion des phéromones, donc la forme du futur nid. En effet, la construction d'une paroi ou d'une galerie par exemple affecte et canalise le flux de phéromone. Ceci induit une réponse des ouvrières, qui vont alors ajuster leur construction en fonction du nouveau gabarit. Les fourmis, par leurs actions collectives et par auto-amplification, modifient leur environnement topologique et chimique, et en retour, ces modifications influencent le comportement global de la colonie. Enfin, des effets externes peuvent influencer sur le comportement de l'ensemble de la colonie. L'ensemble de ces observations est caractéristique de l'apparition de propriétés émergentes dans la colonie. Toutes ces caractéristiques se retrouvent dans le comportement collectif des microtubules.

3.3.3. Les systèmes collectifs en informatique : les sociétés de Robots et autres applications

Grâce aux remarquables facultés d'adaptation des systèmes collectifs et aux propriétés qui en émergent, un grand nombre de travaux se sont dirigés vers leur mise en application dans des domaines tels que la robotique ou l'informatique [Bonabeau et al 1999]. En dehors des remarquables capacités de ces applications, il est intéressant de constater que les mêmes propriétés émergentes apparaissent dans ces groupes d'automates, qui ne sont pourtant pas des systèmes vivants. L'étude des comportements "sociaux" de tels systèmes collectifs est très instructive, car les individus les composant sont beaucoup plus simples que de vraies fourmis, amibes ou autres, et pourtant leur activité "sociale" les amène à des comportements tout à fait réalistes, aussi complexes parfois que ceux que l'on observe dans la nature.

En robotique, l'approche suivie jusqu'à récemment consistait à créer un robot unique comprenant un grand nombre de fonctions, capable d'intégrer des informations et de réagir en

conséquence de façon autonome. On peut citer notamment les sondes spatiales (ex: sondes Voyager). Le défaut majeur de cette approche est qu'en milieu hostile (en dehors du laboratoire), il existe une infinité de situations complexes, et, pour chaque situation, une infinité de variantes. Or, il est impossible de définir toutes ces situations à l'avance et il est très probable qu'un robot se retrouvera vite confronté à une impasse décisionnelle, dont il ne pourra se sortir sans intervention humaine.

Une façon de résoudre ces problèmes est de doter ce robot d'un réseau neuronal intégrant les informations et contrôlant ses actions, pour qu'il soit capable de résoudre lui-même cette situation par apprentissage, grâce à un grand nombre d'essais et d'erreurs à l'instar d'un jeune enfant qui apprend beaucoup par essais successifs. L'inconvénient de cette méthode est que l'apprentissage peut être parfois très long. De plus, il peut arriver que, lors d'un essai, une erreur lui soit fatale, surtout s'il est isolé sans aide extérieure.

L'arrivée des systèmes collectifs a donc été un grand pas en avant en robotique. Le principe de ces robots est très différent. Au lieu d'un unique robot se consacrant à une tâche complexe, avec toute la lourdeur de l'analyse de la situation et de la résolution du problème que cela implique, on dispose maintenant de tout un groupe de robots individuellement très simples, mais pouvant communiquer entre eux. C'est de l'intelligence en essaim.

Le premier avantage d'une telle configuration est l'augmentation de la capacité à survivre. Comme dans tous les systèmes collectifs, la disparition d'un individu ne modifie en rien les capacités de la colonie, s'il reste suffisamment d'individus, bien entendu. Par exemple, si une fourmi meurt, cela ne remet pas en question l'activité de sa colonie. Lors du transport de nourriture entre la source et la fourmilière, la disparition de cette fourmi ne change pas le processus de transport, car les autres fourmis, en très grand nombre, assurent aussi cette fonction. Cette redondance est donc un gage de stabilité de la colonie. Sachant cela, vaut-il alors mieux utiliser un robot unique de faible capacité à survivre ou bien toute une population très résistante de petits robots simples, pour des missions spatiales par exemple ? Le coût de telles missions plaide bien en faveur de la deuxième solution !

On peut alors se poser la question quant aux capacités de tels systèmes robotisés à remplir une fonction. Prenons par exemple la collecte d'informations sur un terrain inconnu. En fait, cela ne diffère quasiment pas de la recherche de nourriture dans le cas des fourmis. Un robot qui trouve quelque chose va le communiquer aux autres. Ceux-ci vont alors venir l'aider ou au contraire s'en éloigner pour chercher ailleurs et se répartir ainsi plus efficacement sur le terrain, selon les règles de réponse dont dispose chacun. On montre ainsi qu'ils sont capables d'effectuer rapidement le tri ou la collecte de matériaux et ce, bien plus efficacement

que ne le ferait un robot unique voué à cette fonction [Bonabeau et al 1999]. On constate que cette méthode de tri émerge aussi dans les colonies de fourmis quand on dispose de façon homogène, dans une boîte, des fourmis vivantes et des fourmis mortes. Les fourmis trient de la même façon (avec un mode de communication différent) les fourmis mortes et les disposent en petits tas qu'elles regroupent peu à peu [Hölldobler and Wilson 1991, Bonabeau et Theraulaz 2000]. L'action collective de populations d'individus individuellement simples permet de déplacer efficacement et d'ordonner des objets inertes (Figure 8). Nous verrons que, dans les populations de microtubules également, cette fonction émerge de l'auto-organisation.

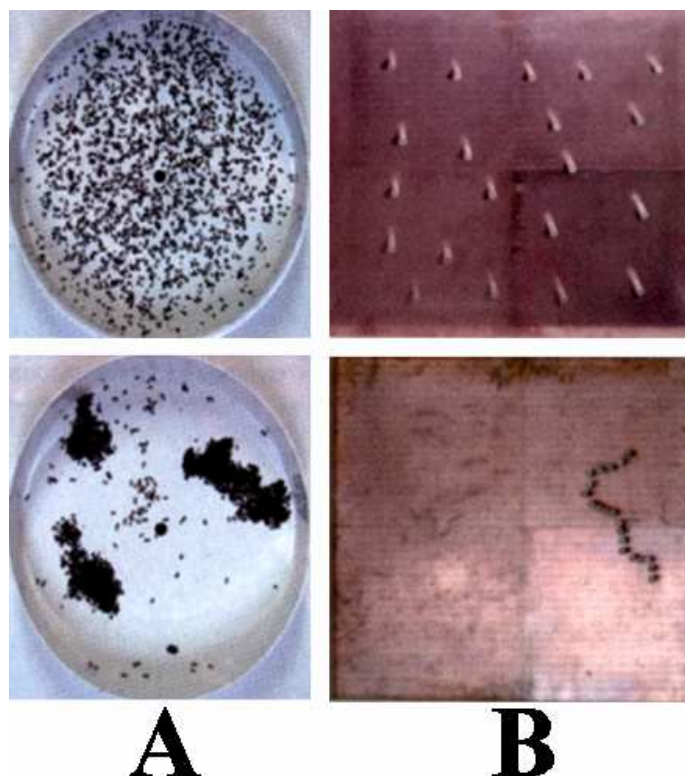


Figure 8. *L'intelligence en essaim. Des fourmis sont capables de ranger des objets pour les rassembler en petits tas bien ordonnés (A). Des robots collectifs sont capables de la même performance avec des objets inertes (B). Les photographies montrent en haut les objets inertes répartis uniformément, en bas les objets une fois ordonnés (des fourmis mortes en (A) et des plots en plastique en (B)). L'auto-ordonnancement d'objets inertes émerge spontanément de processus collectifs (D'après Bonabeau et Theraulaz, 2000). Ceci est à comparer avec l'auto-ordonnancement des billes de polystyrène dans les solutions microtubulaires auto-organisées (cf. Figure 19)*

Enfin, la capacité des systèmes collectifs à résoudre naturellement et à moindre coût le problème du voyageur de commerce, c'est-à-dire la recherche des plus courts chemins, a été

utilisée pour optimiser plusieurs réseaux de communication comme le réseau Internet. Un gros problème de ces réseaux est inhérent aux systèmes de routage de l'information. Le réseau Internet est une toile d'araignée dont les nœuds sont les routeurs et les fils, les câbles du réseau reliant les routeurs. Pour accéder à un autre ordinateur, on parcourt le réseau de câble en câble en passant par ces routeurs. Il existe une très grande quantité de chemins possibles pour parvenir à ces fins. Le but des routeurs est de déterminer le chemin optimal à chaque nœud. En effet, si un grand nombre de personnes est connecté dans une partie du réseau, celui-ci est vite saturé. Le chemin devra donc éviter cette zone. Cependant, les systèmes de routage ne fonctionnent pas toujours très bien, d'abord parce qu'il n'est pas facile de déterminer aisément les zones à éviter au niveau de chaque routeur, mais surtout parce que le système de routage fonctionne de façon locale ; le chemin n'est pas déterminé d'un bloc du début jusqu'à la fin, mais à chaque étape de chemin. Dans ce cas, il est donc possible de suivre des chemins très complexes, voire aberrants, même entre deux ordinateurs géographiquement très proches. La gestion du routage par un système collectif offre une alternative très efficace. On lâche pour cela des fourmis virtuelles dans le réseau [Bonabeau et Theraulaz 2000]. Ces fourmis se déplacent alors librement de nœud en nœud par les câbles du réseau, sans contraintes de direction imposées par les routeurs. Elles déposent sur leur passage, au niveau de chaque routeur, des phéromones virtuelles que les autres fourmis peuvent "voir". Contrairement aux vraies phéromones, celles-ci se dégradent rapidement dans le temps, ceci afin de pouvoir changer facilement et rapidement de chemin si la fluidité du réseau est modifiée. Plus un chemin est fluide, plus le nombre de passage de fourmis sur ce chemin sera élevé ; la quantité de phéromones virtuelles sera élevée en conséquence. Les fourmis vont ainsi déterminer le chemin le plus rapide du réseau. Les routeurs n'ont alors plus qu'à suivre comme indication les chemins rapides marqués par les fourmis virtuelles.

Que peut-on retenir de tout cela ? Il est évident que ces systèmes ne sont qu'artificiels, cependant ils reproduisent sans peine les comportements de leurs équivalents naturels. Pourtant, ces populations d'automates sociaux n'ont pas été programmées pour réaliser les fonctions demandées et comportements observés. Ce qui a été programmé, ce sont juste une ou plusieurs activités individuelles simples, comme par exemple la production de phéromones, ainsi que les règles de communication entre individus, notamment les déplacements ou toute autre réponse en fonction des quantités de phéromones. L'émergence de telles propriétés ne dépend donc pas de la nature des individus, mais bien du couplage entre les activités de chaque individu d'un groupe par une quelconque forme de

communication. Effectivement, on peut bloquer ce couplage dans des systèmes naturels (inhibition des phéromones par exemple), comme dans les systèmes artificiels. On assiste alors à l'inhibition totale d'une quelconque activité collective. Ensuite, les particularités de chaque système, notamment la façon dont ils s'auto-organisent, ne dépendent que des activités spécifiques de chacun des protagonistes dans la colonie, ainsi que du mode d'intercommunication utilisé et de ses caractéristiques.

Chapitre 2 - Généralités sur les microtubules : comportement dynamique et auto-organisation

"La fibre est pour le physiologiste ce que la ligne est pour le géomètre" **Albrecht Von Haller**

C'est un fait bien établi, les microtubules ne se résument pas à de simples tiges statiques. Ils sont pourtant encore trop souvent associés à des 'poutres' constituant la charpente interne des cellules. Non, les microtubules sont aussi des structures extrêmement dynamiques et au comportement particulièrement complexe. C'est d'ailleurs probablement cette difficulté à entrevoir toutes les facettes de leur fonctionnement qui a amené certains biologistes à ne plus considérer que leur aspect de simple pièce mécanique. En explicitant leur dynamique, nous verrons dans ce paragraphe qu'il n'en est rien. C'est justement leur dynamique non linéaire qui procure aux populations de microtubules les propriétés d'un système complexe, en particulier la possibilité de s'auto-organiser.

Ce chapitre de présentation des microtubules ne prétend pas en être une description exhaustive, tant leur dynamique est compliquée et par ailleurs controversée. Nous nous limitons donc à ne présenter que leurs principaux aspects servant de pré-requis à la compréhension des phénomènes que nous décrirons par la suite et à la modélisation de la population de microtubules. Nous commencerons par décrire quelques aspects particuliers du comportement des solutions de microtubules. Nous descendrons ensuite au niveau de leur dynamique individuelle, car c'est ce qui nous intéresse particulièrement pour comprendre comment est construit et fonctionne le modèle que nous proposons.

1. Description générale des microtubules. Rôle des microtubules dans les cellules

Les microtubules [Alberts et al 1983, Dustin 1984], nous l'avons rapidement mentionné, sont de longs tubes de 24 nm de diamètre qui se forment par auto-assemblage d'une molécule dimérique, la tubuline (Figure 9). Cette molécule a une longueur de 8 nm et est constituée de deux sous-unités nommées α et β , d'un poids moléculaire de 55 kDa chacune. Le dimère de tubuline fixe sous sa forme active une molécule énergétique, la Guanosine Triphosphate (GTP); sa forme inactive est liée à la Guanosine Diphosphate (GDP).

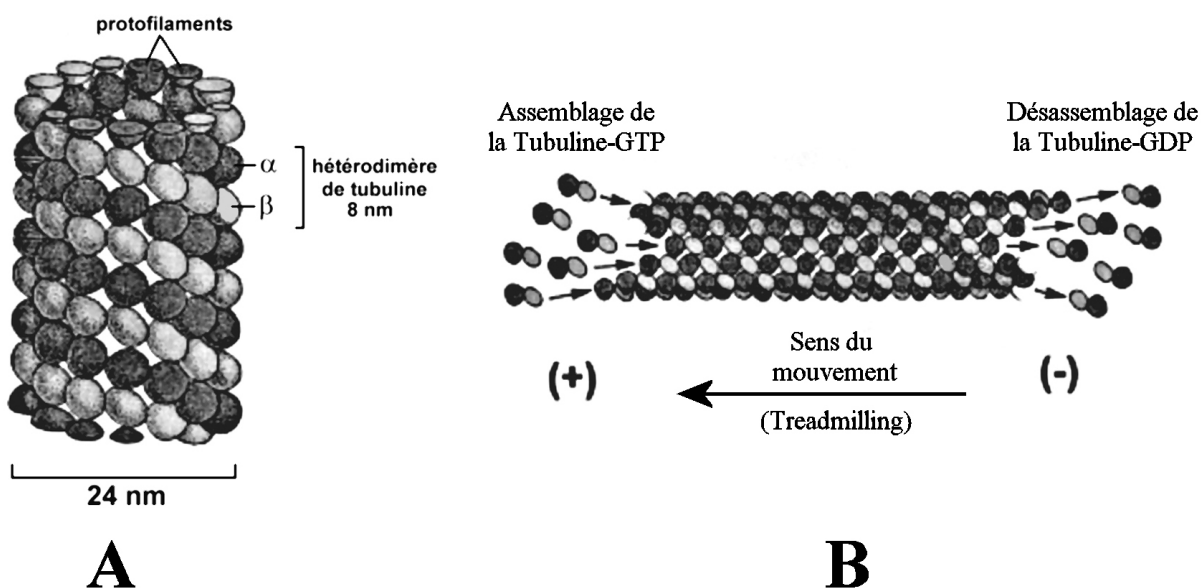


Figure 9. Structure d'un microtubule (d'après Darnell et al. 1986). Les microtubules sont constitués de l'assemblage en spirale de dimères de tubuline α et β . Les dimères de tubuline sont alignés selon 13 protofilaments (A). La polarité structurale des microtubules induit une différence de réactivité entre ses deux extrémités (B). Dans des conditions réactives équivalentes, l'assemblage se fait préférentiellement à l'extrémité positive (+) tandis que le désassemblage se fait à son extrémité négative (-). Il en résulte un mouvement du microtubule dans le sens de son extrémité croissante : c'est le phénomène de treadmilling (cf. Figure 14).

Ces macromolécules sont des organites intracellulaires. Ils constituent, avec deux autres molécules fibrillaires, l'actine et les filaments intermédiaires, la majeure partie du cytosquelette. L'ensemble du cytosquelette permet de donner aux cellules une cohésion structurale, l'empêchant de n'être qu'un sac flasque sans résistance ni réactions à la contrainte. Le cytosquelette donne à chaque type cellulaire une forme qui lui est propre, par exemple une forme en fuseau pour les fibroblastes, une forme rectangulaire pour les cellules intestinales ou encore la forme si caractéristique des neurones avec leur corps cellulaire hérissé de longs prolongements, les dendrites et l'axone. Ce sont également les microtubules qui constituent les cils, flagelles et autres villosités qui tapissent les faces de certaines cellules comme les cellules sensorielles de l'oreille interne ou les cellules ciliées du conduit respiratoire, et qui assurent la motilité d'autres types cellulaires, comme les cellules tueuses du système immunitaire ou les spermatozoïdes. En plus de ce rôle structural, les microtubules contrôlent un grand nombre de fonctions dans les cellules. Citons notamment la division cellulaire, dans laquelle ils constituent le fuseau mitotique assurant la ségrégation des paires

de chromosomes, ou encore le transport contrôlé de matériel cellulaire stocké dans des vésicules lipidiques.

Dans les cellules, les microtubules existent sous une forme ‘libre’, le microtubule évoluant à sa guise dans la cellule, et sous une forme ‘amarrée’ dans laquelle une de ses extrémités au moins est retenue par des molécules associées. En général, les cellules disposent d’un ‘centre organisateur’ autour duquel s’établit toute l’organisation interne de la cellule. Ce ‘centre organisateur’ est constitué par un groupe de microtubules associés nommés centrioles (au nombre de deux en général), une forme de microtubule ‘amarrés’. Depuis les centrioles, les microtubules s’allongent vers la périphérie cellulaire. Les cils sont un autre exemple de structure cellulaire amarrée dans lesquels les microtubules sont fixés entre eux en particulier à la base du cil par des protéines associées (la plaque basale). D’autres microtubules dans la cellule ne sont pas fixés et peuvent librement évoluer. Ces derniers renforcent l’organisation interne des cellules en s’organisant autour du centre organisateur (matériel péricentriolaire), en se dirigeant du centre de la cellule vers la périphérie, selon un turn-over permanent [Alberts et al 1983, Keating and Borisy 1999, Vorobjev et al 1999]. Ce sont ces mêmes microtubules qui servent au déplacement ordonné de particules intracellulaires.

L’importance des microtubules dans les processus cellulaires est telle, qu’empêcher leur formation ou affecter leur fonctionnement par des drogues, comme la colchicine ou le taxol est souvent un moyen de détruire certaines cellules, notamment les cellules cancéreuses [Alberts et al 1983]. Leur implication dans de nombreux dysfonctionnements cellulaires a été démontrée. Un point qui nous intéresse particulièrement est leur sensibilité vis-à-vis de la gravité qu’ils transmettent aux cellules : dans l’espace, en absence de pesanteur, le réseau de microtubule est désorganisé. La conséquence de ceci se présente comme une altération des processus cellulaires chez les sujets soumis au stress de l’apesanteur [Hughes-Fulford et al 1996, Cogoli-Greuter et al 1998, Lewis et al 1998, Vassy et al 2001].

2. Comportement des populations de microtubules *in vitro*

Quand elle est réchauffée de 4°C à 35°C en présence de GTP, de la tubuline purifiée peut s’assembler sous forme de microtubules dans un tube à essai [Weisenberg 1972][cf. Annexe 1]. Les solutions de microtubules *in vitro* peuvent adopter des comportements remarquables.

Dans certaines conditions réactives, la solution toute entière présente des oscillations temporelles amorties, de la concentration en microtubules. Selon les conditions, les

oscillations ont lieu partout dans la solution au même moment [Pirollet et al 1987, Carlier et al 1987, Mandelkow et al 1988], ou bien, on peut observer des vagues de concentration en microtubules se déplaçant à vive allure dans la solution ; dans ce dernier cas, les oscillations temporelles ont, en plus, une dimension spatiale [Mandelkow et al 1989].

Dans d'autres conditions réactives, les solutions de microtubules adoptent un comportement inhabituel pour un système *in vitro*. Ces solutions forment progressivement des morphologies fortement organisées présentant des alternances périodiques de concentration [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000] et d'orientation [Tabony and Job 1992-a] des microtubules. Les nombreuses expériences réalisées de 1990 à nos jours ont montré que, contre toute attente, ces structures sont des structures dissipatives [Tabony and Job 1990], auto-organisées comme des structures de Turing et se comportent comme cela est prédit par les théories évoquées précédemment. Les microtubules s'auto-organisent par des processus de réaction-diffusion [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Comme Kondepudi et Prigogine l'ont prédit pour les systèmes de réaction-diffusion, ces solutions de microtubules s'auto-organisant par réaction-diffusion, possèdent des propriétés de bifurcation [Tabony 1994, Tabony 1996-b] et sont sensibles à l'action de la gravité [Tabony and Job 1992-b, Papaseit et al 2000, Tabony et al 2001-a, Glade and Tabony 2001, Tabony et al 2002-a]. L'auto-organisation des microtubules *in vitro* constitue le premier exemple de système biologique s'auto-organisant par des processus de réaction-diffusion dans un tube à essai. Dans tous les cas, ces comportements (auto-organisation et oscillations) sont dissipatifs car ils font intervenir la consommation permanente d'énergie sous forme de GTP [Tabony and Job 1990].

2.1. Les oscillations temporelles des solutions de microtubules

Les oscillations temporelles de la concentration en microtubules ont été observées *in vitro* en suivant dans un spectrophotomètre, la turbidité à 350 nm de solutions de microtubules. Ces solutions ne contenaient que de la tubuline purifiée à partir de cervelles de bœuf et un tampon comprenant notamment du GTP, un système de régénération du GTP et du magnésium. Durant environ un quart d'heure [Carlier et al 1987] à une heure [Pirollet et al 1987], les solutions oscillantes de microtubules présentent des variations périodiques de la concentration en microtubules. La période des oscillations est comprise entre une [Carlier et al 1987] et dix [Pirollet et al 1987] minutes selon les conditions et les écarts entre la concentration maximale en microtubules (après assemblage) et la concentration minimale

(après désassemblage) sont de l'ordre de 35 % [Carlier et al 1987] à 90 % [Pirollet et al 1987] du maximum de concentration mesuré. Les oscillations disparaissent progressivement et la solution se stabilise; la concentration en microtubules atteint un plateau.

Ces solutions, quand on les observe présentent de longues zones allongées concentrées en microtubules se déplaçant rapidement à des vitesses de l'ordre de 1 mm par minute et traversant les échantillons de part en part comme des vagues [Mandelkow et al 1989]. Ces vagues sont périodiquement remplacées par d'autres qui se déplacent à la même vitesse. Voilà un comportement qui rappelle fortement ce que l'on observe dans la réaction de Belousov (cf. section 3.2 du chapitre précédent) !

Plusieurs facteurs réactifs peuvent permettre l'obtention d'oscillations temporelles dans les solutions de microtubules. En particulier, il a été montré que la vitesse de régénération de la tubuline-GTP à partir de la tubuline-GDP est un facteur critique : une vitesse de régénération lente provoque des oscillations [Melki et al 1988]. Une forte concentration en magnésium peut également permettre cela. Le magnésium est un agent augmentant la réactivité des microtubules (vitesse d'assemblage et de désassemblage) [Dustin 1984, Carlier et al 1987]. Pour obtenir des oscillations, il semble falloir diminuer le rapport entre la vitesse de régénération de la tubuline et la réactivité des microtubules, c'est-à-dire le rapport entre la vitesse à laquelle la tubuline est recyclée et la vitesse à laquelle elle est consommée.

Au niveau moléculaire, la présence d'oscillations dans les solutions microtubulaires demande la synchronisation de l'activité de l'ensemble des microtubules présents dans la solution. Lors d'une oscillation de la concentration, tous les microtubules commencent par s'assembler en même temps ; la tubuline-GTP est rapidement consommée et, quand elle vient à manquer, tous les microtubules de la solution deviennent instables et se mettent à se désassembler. Pendant ce temps, la tubuline-GDP relâchée par le fort désassemblage est régénérée lentement. Un nouveau cycle peut alors recommencer. Si l'activité de l'ensemble des microtubules n'était pas synchronisée, on ne verrait pas apparaître d'oscillations car la moyenne des comportements individuels serait monotone. C'est d'ailleurs la désynchronisation progressive des microtubules qui provoque l'amortissement des oscillations que l'on observe [Carlier et al 1987].

2.2. Auto-organisation des solutions de microtubules

Dans d'autres conditions, ces mêmes solutions de microtubules peuvent adopter un autre type de comportement. Ces solutions s'auto-organisent progressivement en morphologies macroscopiques présentant des alternances périodiques de concentration et d'orientation des microtubules. Le processus d'auto-organisation dure 5 heures environ, mais la morphologie qui va se former est déterminée très tôt dans le processus, aux alentours de la 6^{ème} minute, par l'action de la gravité sur la solution de microtubules [Tabony and Job 1992-b, Tabony 1994, Tabony 1996-b]. Une fois formées, les morphologies restent stationnaires tant que la solution ne tombe pas à cours d'un des réactifs. En général, les solutions contiennent suffisamment de GTP pour rester auto-organisées durant 48 à 72 heures. Au-delà, le milieu tombe en panne de GTP et la tubuline, qui est une protéine, fini par se dégrader progressivement.

Les conditions nécessaires à l'obtention de l'auto-organisation sont très proches de celles qui aboutissent à des oscillations. Dans ce cas cependant, la tubuline est régénérée très rapidement car on ajoute dans la solution soit un excès de GTP (2 mM) soit un système de régénération puissant à base d'Acétyle phosphate et d'Acétate Kinase, ce, afin que la vitesse d'échange du nucléotide sur la tubuline ne soit plus limitante.

2.2.1. Description des morphologies microtubulaires auto-organisées

Dans des cuves en verre rectangulaires de 4 cm x 1 cm x 1 mm, les morphologies microtubulaires auto-organisées qui se forment sont composées de longues stries macroscopiques de 0.5 mm de largeur (Figure 10). La striation apparaît lorsqu'on regarde l'échantillon en lumière polarisée (cf. Annexe 2.1). Une alternance de bandes claires et de bandes sombres trahit la forte orientation à 45 ou 135 ° des microtubules dans les stries [Tabony and Job 1992-a]. Toujours en lumière polarisée, si l'on rajoute entre l'échantillon et l'analyseur une lame retardatrice λ placée à 45° par rapport à l'axe des polariseurs, on lève la dégénérescence d'orientation des microtubules : on observe ainsi une alternance de bandes de couleur d'interférence jaune et de bandes bleues. Les bandes bleues correspondent à une orientation des microtubules à 45° (donc parallèles à la lame λ) et les bandes jaunes à une orientation à 135° (perpendiculaire à λ). La morphologie formée présente donc une alternance de stries de microtubules orientés successivement à 45° puis à 135°.

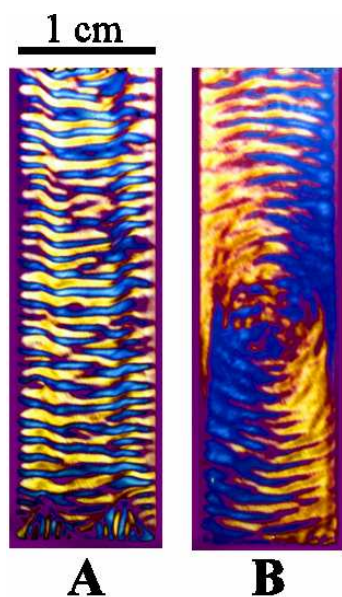


Figure 10. Morphologies microtubulaires auto-organisées formées dans des cuves en verre de 40 x 10 x 1 mm. Les photographies (A) et (B) sont prises en biréfringence (cf. Annexe 2.1). Des alternances de stries bleues et jaunes attestent de l'alternance périodique d'orientation des microtubules. Dans les stries bleues les microtubules sont orientés à 45° par rapport à la verticale et dans les stries jaunes à 135°. La morphologie formée dans une cuve verticale (A) présente des stries horizontales, tandis que celle formée dans une cuve disposée à l'horizontale (B) est formée de stries en cercles concentriques.

Une question importante était de savoir si, en plus du motif d'orientation, il y avait un motif de concentration. En effet, la formation d'un motif de concentration est une des caractéristiques essentielles des structures de Turing. Si les morphologies microtubulaires sont obtenues par réaction-diffusion, elles doivent comporter un motif de concentration. Deux types d'expériences ont été faites dans ce sens [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Tout d'abord, des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles : un balayage d'un échantillon de microtubules auto-organisés par un faisceau de neutrons a permis d'obtenir par cette technique une visualisation très efficace du profil de concentration en microtubules. Cette coupe de l'échantillon montre une variation périodique de la concentration en microtubules, alternant des zones de forte concentration et des zones dont cette concentration chute de 30 % environ. Chaque variation de la concentration en microtubules correspond au passage d'une strie d'orientation à l'autre. Cela a été ensuite renforcé par des observations faites en fluorescence après marquage spécifique des microtubules au DAPI (cf. Annexe 2.4). Encore une fois, ce motif strié rappelle celui que l'on obtient dans la réaction de Belousov-Zhabotinski. Notons également que dans les deux cas, les conditions d'obtention de motifs stationnaires sont très proches de celles des solutions oscillantes.

L'observation d'une strie de 0.5 mm au microscope révèle l'existence d'autres niveaux de striation [Tabony et al 2000]. On peut ainsi observer à l'intérieur des stries de 0.5 mm, des stries de 100 µm de large dont le grand axe est perpendiculaire au grand axe de la strie de 0.5 mm. À un plus fort grossissement, on peut encore observer une telle imbrication avec des stries de 20 µm, 5 µm et 1 µm (Figure 11). Les morphologies microtubulaires auto-organisées sont donc des structures auto-semblables.

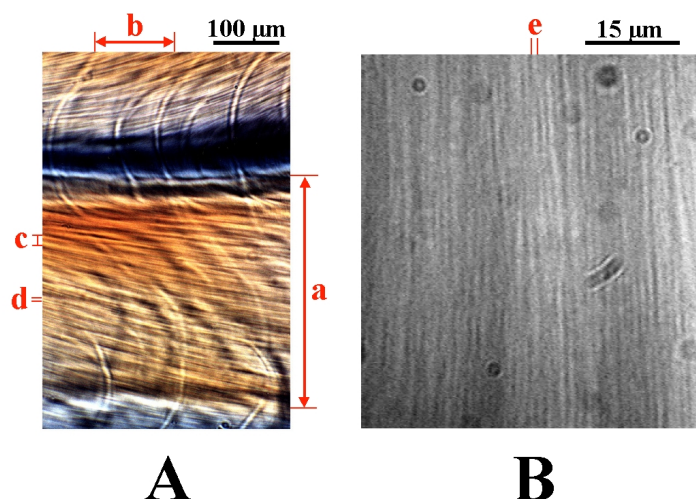


Figure 11. L'auto-organisation se fait également à de petites échelles de distance. Les grandes stries de 0.5 mm contiennent des petites stries imbriquées sur plusieurs niveaux. La photographie (A) prise entre polariseurs circulaires croisés montre dans les stries de 400 μm (a) des petites stries de 100 μm (b), 20 μm (c), 5 μm (d). À plus fort grossissement (100x), la photographie (B) prise en DIC montre également des stries de 1.5 μm (e). L'imbrication des stries dans les stries, fait des morphologies microtubulaires auto-organisées, des structures auto-semblables, car, il est difficile de savoir quelle est l'échelle d'une strie sans disposer d'une référence d'échelle.

Selon les formes et dimensions des échantillons, d'autres morphologies souvent striées peuvent apparaître.

2.2.2. Effet de la gravitation sur le développement des morphologies

Le motif qui se forme dépend aussi de la disposition de l'échantillon par rapport à la direction de la gravité [Tabony and Job 1992-b]. Quand la cuve rectangulaire est disposée de façon verticale c'est-à-dire dans l'axe de la gravité, la morphologie est composée d'une série de stries horizontales disposées les unes au-dessus des autres depuis le bas jusqu'en haut de l'échantillon. Dans une cuve disposée à plat, donc perpendiculaire à l'axe de la gravité, les stries se développent de façon concentrique par rapport au centre de l'échantillon (Figure 10).

Kondepudi et Prigogine [Kondepudi and Prigogine 1981, Kondepudi 1982, Kondepudi and Prigogine 1983] ont démontré mathématiquement que les systèmes de réaction-diffusion étaient sensibles à la gravité parce qu'à un moment précoce du processus d'auto-organisation, ces systèmes éloignés de l'équilibre pouvaient présenter une instabilité chimique et devenir instables; en ce point d'instabilité, le moindre effet externe perturbe le système instable et le

force à choisir une voie de développement (Figure 2). Comme les solutions de microtubules sont des structures dissipatives sensibles à l'action de la gravité, il était possible qu'elles possèdent des propriétés de bifurcation. C'est effectivement le cas [Tabony 1994, Tabony 1996-b]. L'échantillon n'est sensible qu'un court instant à l'action de la gravité puisque la morphologie qui va se former (stries horizontales ou stries concentriques), est déterminée à un moment précis, précoce dans le processus d'auto-organisation. Le motif futur est déterminé à la 6^{ème} minute du processus et si l'on change l'orientation de l'échantillon par rapport à la gravité après cet instant, ce dernier conserve la mémoire de l'orientation qu'il avait à la 6^{ème} minute. Ceci a été montré grâce à une expérience simple : 20 échantillons ont été préparés dans des cuves de spectrophotomètre (de 4 cm x 1 cm x 1 mm) et numérotés de 1 à 20. Tous ont été placés verticalement au même moment en chambre chaude à 37°C. Toutes les minutes, un échantillon était basculé à l'horizontale (à plat) : l'échantillon N°1 à la première minute, le 2^{ème} à la 2^{ème} minute, et ainsi de suite jusqu'au 20^{ème} à la 20^{ème} minute. Tous les échantillons étant resté moins de 6 minutes à la verticale (c'est-à-dire basculés horizontalement avant la 6^{ème} minute) présentaient des morphologies en forme de cercles concentriques. Tous ceux qui ont été basculés après la 6^{ème} minute présentaient des stries horizontales. Ce moment critique est corrélé à une instabilité chimique dans la réaction d'assemblage des microtubules qui se produit à cet instant précis (Figure 12 A).

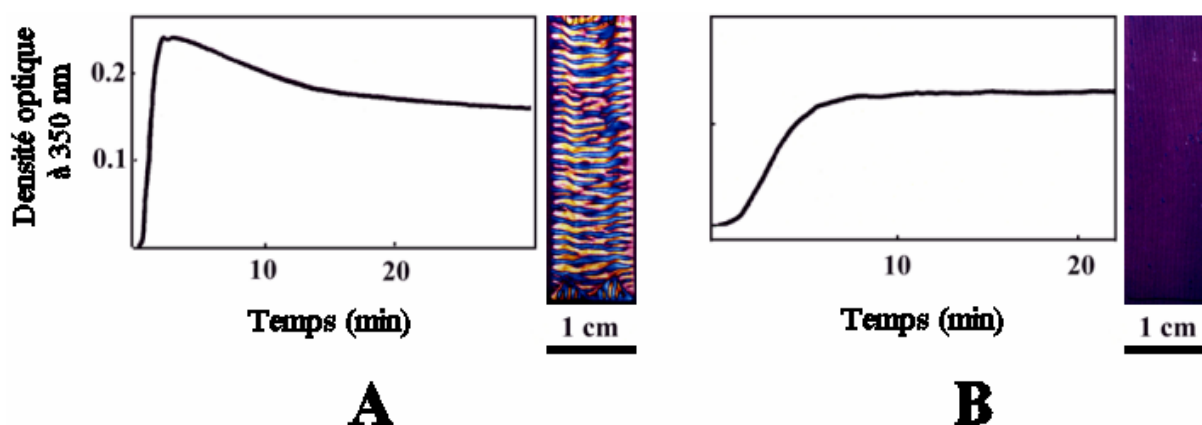


Figure 12. La cinétique d'assemblage d'une solution de microtubules peut être suivie par densité optique à 350 nm (turbidimétrie). Dans les conditions appropriées, les microtubules s'auto-organisent; leur cinétique d'assemblage présente alors une instabilité chimique (dit 'overshoot') aux alentours de la 6^{ème} minute du processus (A). La réaction commence par une phase d'assemblage intense jusqu'à la 6^{ème} minute. A ce moment là, les microtubules deviennent instables et ils se mettent à désassembler. Après la phase de désassemblage la concentration en microtubules se stabilise

progressivement. Si par contre on stabilise les microtubules (taxol), la cinétique d'assemblage ne présente plus 'd'overshoot' (B) et la solution ne s'auto-organise pas.

Une fois le moment d'instabilité dépassé, la morphologie est déterminée et devient insensible à l'action d'un quelconque champ externe. Si un échantillon, développé horizontalement pendant 8 minutes, est centrifugé à 50 g selon son grand axe (comme s'il était vertical sous une pesanteur de 50 fois la gravité terrestre), durant 10 minutes, la morphologie qui se développe durant 5 heures est bien une morphologie horizontale (Figure 13). Bien entendu, si cette opération est faite avant l'instant critique, la morphologie qui se forme est de type vertical. Initialement cette expérience avait été réalisée avec un tourne-disque en guise de centrifugeuse, fournissant une accélération de 0.14 g [Tabony 1996 (a), Tabony 1996 (b)]



Figure 13. *Effets de la centrifugation et détermination des morphologies microtubulaires. Disposée à plat, une solution de tubuline mise à assembler à 35°C à 1 g aboutit à la formation d'une morphologie en cercles concentriques (A). Si l'on centrifuge la solution à 50 g, selon le grand axe de l'échantillon, à partir du début de la réaction et durant 10 minutes, une morphologie verticale se forme avec des stries très serrées et en grand nombre (B). Si l'on centrifuge à 50 g durant 10 minutes, mais après que la bifurcation ait eu lieu, la morphologie obtenue après 5 heures de développement, bien qu'un peu déformée par la forte centrifugation, est une morphologie de type couchée (C). Après l'instant de bifurcation, même si aucune structure n'est encore visible, la morphologie future qu'adoptera l'échantillon est déjà déterminée.*

Ces expériences sont particulièrement importantes, car, le fait que la solution possède des propriétés de bifurcation et qu'elle n'est sensible à la gravité qu'en cet instant précis (le moment de l'overshoot), signifie qu'il suffit d'exposer l'échantillon à une période d'apesanteur couvrant tout juste ce point d'instabilité, pour empêcher l'auto-organisation de se faire.

Une expérience embarquée dans une fusée sonde de l'Agence Spatiale Européenne l'a confirmé [Papaseit et al 2000, Tabony et al 2001-a]. Deux séries de préparations dans des cuves de spectrophotomètre, placées dans le module thermostaté d'une fusée sonde, ont été envoyées dans l'espace durant une quinzaine de minutes. La période d'apesanteur n'a duré que 13 minutes. Une série était dans un compartiment soumis à l'apesanteur durant le vol, tandis que l'autre était dans un compartiment centrifugé à 1 g au cours du vol. La réaction n'a commencé qu'une fois le module en apesanteur, les échantillons à 4°C n'ayant été réchauffés à 35°C qu'une fois le module en apesanteur. Au retour sur terre, les échantillons ont continué à se développer au chaud et ont été analysés après 5 heures. Les échantillons en apesanteur ne s'étaient pas organisés, tandis que les échantillon placés dans la centrifugeuse à 1g embarquée présentaient des morphologies 'terrestres' tout à fait normales (cf. Figure 23). Notons que la période d'apesanteur ne faisait que couvrir les quelques premières minutes de la réaction avec le moment d'instabilité, non pas tout le développement des échantillons. Un autre point important est que, lors de la traversée de l'atmosphère au retour du module, les échantillons ont subi d'intenses vibrations (environ 50 g) durant 1 minute; cela n'a pas pour autant déclenché l'auto-organisation des solutions en apesanteur.

2.2.3. L'auto-organisation des microtubules est due à des processus de réaction-diffusion

Plusieurs expériences montrent que le phénomène d'auto-organisation des microtubules n'est pas dû à des interactions statiques entre les microtubules comme dans les cristaux liquides. L'auto-organisation des microtubules est la conséquence de processus de réaction et de diffusion couplés comme dans un système de Turing. Citons quelques-unes de ces expériences visant à déterminer l'importance des termes réactifs et de la diffusion moléculaire dans ce phénomène [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000] :

Une expérience faite en diffusion de neutrons aux petits angles et ciblant une petite zone d'une préparation au cours de son auto-organisation a montré que la formation des stries passait par un processus durant lequel les microtubules assemblés et orientés se désassemblent partiellement, puis se réassemblent en changeant d'orientation.

D'autres expériences plus simples ont été faites et concordent toutes pour dire que ce système s'auto-organise par des processus de réaction-diffusion.

Une expérience très simple consiste à placer à 4°C une solution de microtubules auto-organisée, puis à la réchauffer à nouveau à 35°C. À 4°C, les microtubules se désassemblent et la structure disparaît. Lorsqu'on la réchauffe à nouveau, une nouvelle structure se forme. La température contrôle l'assemblage des microtubules : ils ne s'assemblent pas à 4°C. Cette expérience prouve que l'auto-organisation est directement dépendante de l'assemblage des microtubules.

La réactivité des microtubules est liée à la température. Si l'on chauffe à 40°C, l'auto-organisation se fait plus vite et la dissipation d'énergie augmente considérablement. Inversement, des préparations placées à 30°C s'auto-organisent mal et surtout se développent très lentement. À cette température, la dissipation d'énergie est moindre [Tabony 1994].

Lorsqu'on détruit l'organisation en mélangeant une solution de microtubules déjà organisée et qu'on laisse la réaction se poursuivre à 35°C, une certaine réorganisation de l'échantillon apparaît progressivement. Cela peut se faire parce que la réactivité des microtubules continue. En effet, si lorsqu'on mélange la solution organisée, on rajoute, en plus, une substance modifiant leur réactivité, du taxol à 45 μM , la solution reste désorganisée. Le taxol stabilise les microtubules et empêche leur désassemblage. Les microtubules ainsi stabilisés, ne peuvent plus se réorganiser entre eux.

Au lieu de stabiliser les microtubules, on peut augmenter leur réactivité en ajoutant du magnésium. Dans ce cas, des concentrations croissantes de magnésium (2 à 10 mM de magnésium contre 1 mM habituellement) inhibent de façon croissante l'auto-organisation. A 5 mM de magnésium, l'auto-organisation a pratiquement déjà disparu.

Il apparaît donc évident que l'auto-organisation est liée à la réactivité de la solution de microtubules. Il est par contre plus difficile de déterminer expérimentalement si la diffusion de la tubuline libre joue un rôle. C'est, ne l'oublions pas, un critère obligatoire pour qualifier les morphologies microtubulaires de système de type Turing.

Des expériences ont quand même pu être faites pour altérer la diffusion moléculaire. Dans le processus d'auto-organisation, la diffusion de la tubuline libre assure la communication entre les microtubules donc la synchronisation dans le temps et dans l'espace de leur réactivité. En augmentant la viscosité de la solution, on peut réduire considérablement la diffusion de ces molécules. Cela peut être fait en gélifiant la solution avec de l'agarose à 0.1 % ou en ajoutant une grosse molécule, le Ficoll 400 à 5 %, qui ralentit la diffusion

moléculaire. Dans ce cas on observe avec la diminution de la diffusion, la perte de l'auto-organisation.

Il reste que cette sensibilité des solutions de microtubules vis-à-vis de la gravité, à un moment d'instabilité chimique précoce dans le processus, est encore une caractéristique des systèmes de type 'Turing'. Lorsque l'instabilité chimique ne se fait pas au cours de la réaction (en stabilisant les microtubules), l'auto-organisation n'a pas lieu (Figure 12B).

En commençant cette étude, nous savions déjà que l'auto-organisation des solutions de microtubules était due à des processus dissipatifs de réaction-diffusion. Il restait à en déterminer les fondements moléculaires, c'est-à-dire, à comprendre ce processus, dont l'aboutissement est macroscopique, en termes de microtubules individuels, s'auto-organisant entre eux par des processus de réaction-diffusion. Cela nécessite tout d'abord de connaître le comportement individuel des microtubules et, qui plus est, de leur cinétique réactionnelle.

3. La dynamique réactionnelle des microtubules individuels

Un microtubule se forme par assemblage successif de dimères de tubuline-GTP. Durant cette réaction, l'hydrolyse du GTP en GDP fournit l'énergie nécessaire à l'assemblage de la tubuline. Une fois qu'un microtubule est formé, la réaction se poursuit à ses deux extrémités par ajout de tubuline-GTP (assemblage) ou par rejet de tubuline-GDP (désassemblage). La tubuline inactive ou tubuline-GDP qui est rejetée, peut être régénérée en tubuline active (tubuline-GTP), par simple échange du GDP lié à la tubuline avec une molécule libre de GTP. La tubuline, ainsi régénérée, peut être utilisée à nouveau dans l'assemblage d'un microtubule. C'est ainsi qu'il a une consommation permanente d'énergie chimique dans le système. Les solutions de microtubules sont donc dissipatives.

Les microtubules sont des structures dynamiques : ils passent leur temps à s'assembler ou à se désassembler. En conséquence, leur durée de vie peut être très longue pour certains et éphémère pour d'autres. Ces deux réactions ne se produisent qu'au niveau de leurs extrémités. Bien que les deux extrémités d'un microtubule aient une réactivité différente, elles sont toutes les deux capables d'assemblage et de désassemblage. On dénote cependant une nette préférence d'une extrémité nommée extrémité 'positive', à croître par assemblage, consommant localement de la tubuline-GTP, tandis que l'autre à davantage tendance à décroître par désassemblage, libérant localement de la tubuline-GDP.

Le problème de la cinétique des microtubules resterait simple si les réactions d'assemblage et de désassemblage de la tubuline se faisaient de façon linéaire, c'est-à-dire proportionnellement aux concentrations locales des réactifs. L'ensemble des observations expérimentales qui ont été faites sur les microtubules montre que ce n'est pas le cas.

Selon les conditions réactives dans lesquelles se trouvent les solutions de microtubules, on peut observer des comportements individuels différents.

Dans l'un de ces comportements caractéristiques nommé 'treadmilling' [Margolis et Wilson 1978], les microtubules, une fois formés, s'assemblent continuellement d'une extrémité tandis qu'ils se désassemblent de l'autre à des vitesses semblables. L'assemblage à une extrémité et le désassemblage à l'autre extrémité induit le mouvement du microtubule. Précisons toutefois, qu'en fait, si l'entité que l'on nomme microtubule semble se 'déplacer' dans la solution, la tubuline qui s'assemble et forme le microtubule ne se déplace pas elle-même. Elle reste à l'endroit de la solution où elle a été assemblée, ne faisant que passer d'un état libre à un état associé au microtubule qui passe, sans pour autant se déplacer. Nous verrons que ce comportement caractéristique est essentiel à l'auto-organisation spatiale de la population de microtubules (Figure 14).

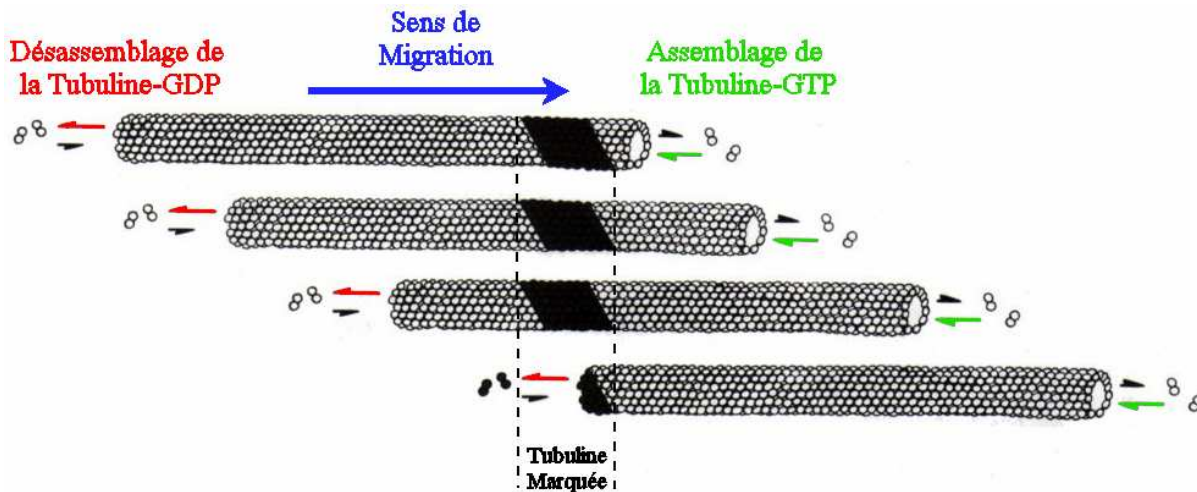


Figure 14. Ce schéma illustre le phénomène de treadmilling, mode réactionnel fréquemment adopté par les microtubules. Dans ce phénomène, la tubuline s'assemble à une extrémité et se désassemble de l'autre. Si l'entité 'microtubule' avance, la tubuline qui le compose ne se déplace pas elle-même, comme le montre la zone de tubuline marquée en noir.

Dans d'autres conditions, l'observation directe de microtubules individuels peut montrer un comportement d'aspect stochastique : Les microtubules alternent d'une façon

aléatoire des phases d'élongation et de raccourcissement, de rapidité et de durée variable. Ce comportement ainsi nommé 'instabilité dynamique' [Mitchison and Kirschner 1984] révèle la dynamique non linéaire des microtubules individuels. Une erreur trop souvent faite est de considérer que ce comportement stochastique est intrinsèque aux microtubules, c'est-à-dire que les passages rapides d'une phase de croissance à une phase de décroissance, et inversement, se produisent de façon aléatoire aux extrémités [Holy and Leibler 1994, Odde et al 1995]. C'est en oublier la dimension spatiale ! Nous pensons que le comportement d'un microtubule individuel est déterministe et non linéaire, car il paraît difficile de concevoir qu'une population d'objets se comportant de manière aléatoire puisse agir de façon concertée et faire émerger de l'ordre et des formes. Les changements brutaux de phase réactive sont dus au fait que les extrémités des microtubules explorent un milieu dont la concentration en réactifs, en l'occurrence la tubuline-GTP et la tubuline-GDP, varie en tout point de l'espace. C'est la réponse non linéaire des extrémités réactives aux variations de concentration des réactifs qui provoque ces changements. Par exemple, considérons un microtubule évoluant dans une solution contenant de la tubuline libre et d'autres microtubules. Lorsqu'une de ses extrémités passe dans une zone contenant une faible proportion de tubuline-GTP, ce qui peut survenir quand plusieurs microtubules consomment de la tubuline-GTP au même endroit de la solution, elle se trouve dans des conditions d'assemblage très défavorables et peut se mettre à se désassembler brutalement. Inversement, si une extrémité, à force de se désassembler, finit par se retrouver dans une zone riche en tubuline-GTP, son désassemblage peut s'arrêter net et son assemblage commencer.

Quelle est l'origine de la non linéarité de leurs réactions ? En ce qui concerne l'assemblage, la non linéarité provient essentiellement du fait que l'extrémité en croissance traverse un milieu dont les concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP sont sans cesse changeantes. La tubuline-GTP favorise l'assemblage. La forme inactive de la tubuline, la tubuline-GDP entre en compétition avec la tubuline-GTP et peut ralentir, voire empêcher l'assemblage du microtubule [Martin et al 1993, Vandecandelaere et al 1995]. Le désassemblage d'un microtubule est plus complexe. L'ensemble des études faites sur la cinétique microtubulaire s'accordent pour dire que les microtubules sont la plupart du temps protégés du désassemblage par une couche protectrice de tubuline active à leurs extrémités, une 'cape' de tubuline-GTP, intrinsèque au microtubule [Carlier and Pantaloni 1981, Mitchison and Kirschner 1984, Chen and Hill 1985, Walker et al 1989, Caplow and Shanks 1995]. Effectivement, le désassemblage efficace du microtubule passe, avant, par l'absence de tubuline-GTP à son extrémité, comme cela a été montré par utilisation d'analogues non-

hydrolysables du GTP [Weisenberg and Deery 1976]. La figure 15 montre une représentation schématique d'une extrémité d'un microtubule.

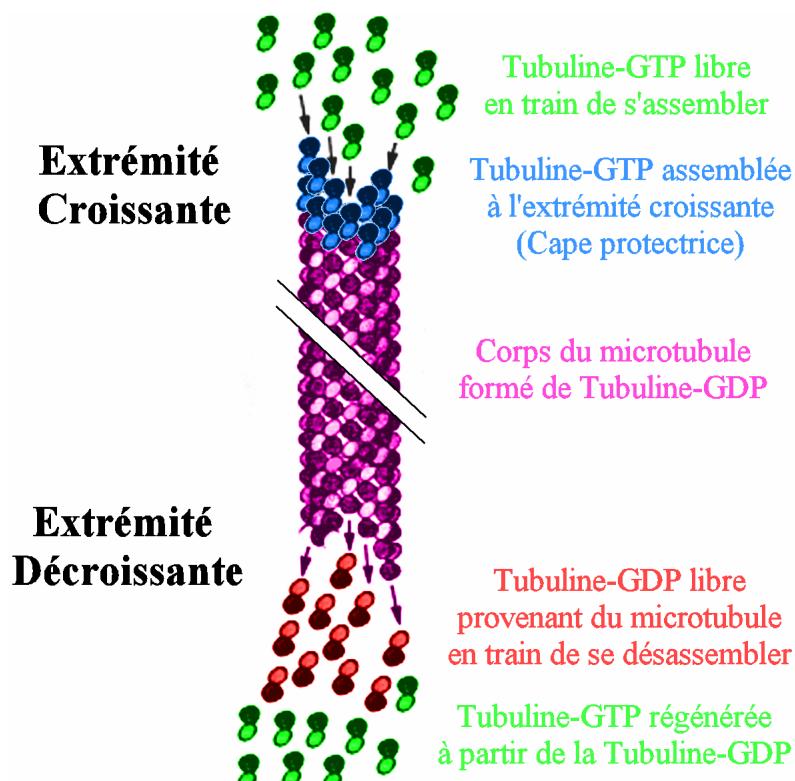


Figure 15. Schéma de l'extrémité d'un microtubule. Dans les conditions favorables, l'extrémité d'un microtubule possède une petite portion de tubuline-GTP, la 'cape' (en bleu), qui s'hydrolyse progressivement en tubuline-GDP formant le 'corps' du microtubule (en violet). Cette portion de tubuline-GTP prévient le microtubule d'un désassemblage brutal. Si cette portion est absente, l'extrémité du microtubule n'est plus protégée et le microtubule peut se désassembler rapidement en tubuline-GDP libre (en rouge). Celle-ci est régénérée ensuite en tubuline-GTP (en vert).

Lorsque l'extrémité d'un microtubule croît, une succession de molécules de tubuline-GTP (active) est ajoutée. Le GTP du complexe tubuline-GTP n'est pas hydrolysé immédiatement. Sa vitesse d'hydrolyse peut, en effet, s'avérer plus lente que la vitesse d'ajout des dimères de tubuline-GTP. Il en résulte une accumulation de quelques molécules de tubuline-GTP à l'extrémité du microtubule. La tubuline-GTP se désassemble moins vite que la tubuline-GDP, donc, quand l'extrémité d'un microtubule se trouve dans une zone contenant très peu de tubuline-GTP, son désassemblage est d'abord très lent jusqu'à ce que la portion protectrice de tubuline-GTP ait été convertie en tubuline-GDP, forme qui compose majoritairement le microtubule. Il existe plusieurs hypothèses quant au réel aspect de ces

capas de tubuline. Certaines études concluent en des longueurs de capas extrêmement courtes, voire constituées d'une seule molécule de tubuline-GTP. D'autres, au contraire, penchent pour des capas de longueur variable, pouvant être importantes, donc pouvant assurer une protection plus longue. Il n'y a actuellement encore aucun consensus sur ce point.

Bien entendu, une description rigoureuse est encore loin de voir le jour, car le comportement individuel réel des microtubules est extrêmement difficile à définir. Leur observation au niveau individuel en est la principale limitation, ceci pour deux raisons : d'abord les microtubules sont d'une échelle nanométrique, donc hors de portée des microscopes optiques, ensuite parce qu'il est difficile d'observer un microtubule dans une population dense et parce que, quand on en isole un (par dilution), on le place dans des conditions réactives différentes. C'est pour cette raison qu'il existe une pléthore d'hypothèses et de modèles différents, parfois contradictoires à ce sujet.

Lors de la description des cinétiques réactionnelles de notre modèle, ces éléments seront repris et davantage détaillés.

EXPERIENCES ET RÉSULTATS *IN VITRO*

Chapitre 1 - Mouvements de particules subcellulaires induits par l'auto-organisation des microtubules

Une très importante partie des activités cellulaires est liée aux mouvements de particules subcellulaires, telles que des organites ou des vésicules lipidiques. Le transport de vésicules est essentiel aux activités cellulaires, car il permet d'amener des métabolites ou des produits de synthèse d'un endroit précis de la cellule à un autre compartiment. Il est maintenant bien reconnu que ce transport de particules est lié au cytosquelette et, en particulier, au réseau de microtubules. Par exemple, dans les neurones, on peut observer un véritable flux de vésicules contenant des neurotransmetteurs depuis le soma jusqu'à la terminaison neuronale [Nixon 1998].

Un autre aspect important est que ces vésicules ne se dirigent pas au hasard et ne sont pas distribuées au hasard dans les cellules. Leurs déplacements sont dirigés vers des zones précises de la cellule. Par des marquages on peut effectivement suivre des vésicules et on observe un ensemble de flux ordonnés de vésicules dans la cellule. On peut en outre constater dans certains cas que ces particules sont ségréguées et s'accumulent dans à des endroits précis, ceci étant lié à des déplacements induits par les microtubules. On peut bien évidemment citer le cas bien connu de la ségrégation des chromosomes sur le fuseau mitotique dans la cellule en anaphase, c'est-à-dire au cours de la division cellulaire. Un autre exemple concerne l'accumulation progressive de vésicules lipidiques dans les cellules végétales en voie de division, sur une zone plane constituant la future séparation de la cellule mère en cellules filles [Pickett-Heaps and Northcote 1966, Alberts et al 1983].

L'explication donnée couramment, concernant les mouvements de particules subcellulaires liés au cytosquelette dans les cellules vivantes, est fondée sur l'existence de moteurs moléculaires. Les moteurs moléculaires ont été identifiés comme étant des macromolécules capables de modifier leur structure en hydrolysant du GTP. Ils font partie d'une famille de molécules capables de se fixer au cytosquelette, notamment aux microtubules. En consommant en permanence du GTP, ils peuvent se déplacer sur les microtubules en alternant des phases de fixation et de relâchement du support. Des moteurs moléculaires comme la kinésine ou la dynéine ont la possibilité de véhiculer des vésicules le

long des microtubules en se fixant, d'un coté, à une vésicule et, de l'autre, au microtubule. Ce sont également des molécules associées d'un type semblables qui sont supposées ordonner le cytosquelette microtubulaire dans les cellules vivantes.

Dans les cellules vivantes, en plus de s'organiser, les microtubules contrôlent la plupart des phénomènes de transport (vésicules, chromosomes ...). Lorsqu'en 1990, J. Tabony et D. Job ont montré que des préparations ne contenant que de la tubuline parfaitement purifiée et du GTP étaient capables de s'auto-organiser sans ces molécules associées, ils prouvaient que l'auto-organisation était une propriété émergente des populations de microtubules. Dans les années qui ont suivi, il est apparu possible qu'une propriété émergente associée à l'auto-organisation et à la formation d'ondes de concentration en microtubules puisse être le déplacement et même l'ordonnement de particules, de quelque type que ce soit, comme des vésicules lipidiques, noyaux cellulaires, billes de polystyrène inerte... (Communication privée (c)). Des expériences préliminaires ont été réalisées en ajoutant des billes de polystyrène dans les solutions de microtubules. Il a été montré que les billes bougeaient uniquement au cours de l'auto-organisation. Il a été observé que les billes commençaient à bouger au début de l'auto-organisation, qu'elles se déplaçaient d'une manière ni aléatoire, ni liée à de l'agitation thermique, que leur trajectoire suivait la direction d'orientation des microtubules et qu'enfin, elles ralentissaient pour ne plus bouger une fois l'auto-organisation des microtubules terminée (Communication privée (d)).

Nous avons montré que des billes de polystyrène inertes [Sigma] pouvaient non seulement se déplacer de façon ordonnée, mais également s'auto-organiser dans des solutions de microtubules *in vitro* capables de s'auto-organiser. En plus d'une étude qualitative, nous avons fait un grand nombre de mesures pour quantifier ce phénomène. Ces solutions ne comportaient aucun moteur moléculaire. Sans remettre en question l'existence des moteurs moléculaires et leurs fonctions, il se pourrait bien que les mouvements de particules uniquement induits par l'auto-organisation des microtubules constituent un mécanisme fondamental présent dans les cellules. Les moteurs moléculaires dans un tel contexte constitueraient une spécialisation ultérieure des cellules pour un contrôle fin des transports vésiculaires.

Les expériences que nous avons faites consistaient à ajouter à nos solutions de tubuline et de GTP, des billes de polystyrène de 1 μm de diamètre, biochimiquement inertes.

Les solutions d'un volume de 200 μl étaient mises à assembler dans les cuves en verre couramment utilisées (4 cm x 1 cm x 1mm), placées horizontalement sous l'objectif du microscope dans un support thermostaté chauffant à 37°C. Nous avons filmé les mouvements des billes en même temps que l'auto-organisation des microtubules en prenant des images de l'échantillon à des intervalles réguliers de 3 secondes. Les observations ont été faites en polarisation croisée en intercalant une lame retardatrice ' λ '. En utilisant l'objectif de grossissement 20x on identifie sans peine les billes une à une et on peut suivre l'auto-organisation sur un champ de vue assez large d'environ 600 μm x 420 μm (cf. Annexe 2). Après chaque expérience, une quarantaine de billes a été suivie sur chaque enregistrement. Leurs trajectoires ont été tracées en portant leurs positions sur des feuilles transparentes à des intervalles réguliers de 10 minutes. A partir de ces trajectoires, les mouvements des billes ont été quantifiés: leur vitesse et leur accélération à différentes périodes de l'auto-organisation ont été calculées. Ce travail est très long et fastidieux et a exigé un grand nombre d'expériences répétées de nombreuses fois.

D'autres expériences et observations ont été faites avec des méthodes différentes, notamment pour l'observation des morphologies auto-organisées de particules.

A. Le mouvement des billes de polystyrène est lié à l'auto-organisation des microtubules

Lorsque l'on met à assembler, à 37°C, dans une cuve en verre disposée à plat, une solution de tubuline contenant 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de tubuline, 2mM de GTP et des billes de polystyrène de 1 μm de diamètre [Sigma - d], on constate que la solution s'auto-organise normalement en morphologie 'couchée' et que les billes se déplacent d'une manière ordonnée. Le fait que les billes se déplacent d'une façon qui n'est pas aléatoire et qu'elle ne bougent plus lorsque l'auto-organisation est terminée indique que leur mouvement est lié à l'auto-organisation des microtubules. Cela peut être vérifié en ajoutant des réactifs qui empêchent l'auto-organisation de se faire mais qui n'empêchent pas la formation des microtubules, par exemple du magnésium à 10 mM ou du Taxol. Dans ce cas, l'assemblage des microtubules se fait mais il n'y a ni organisation des microtubules, ni le moindre mouvement de bille.

Au vu d'une telle observation, sachant que la solution est exempte de moteurs moléculaires et que les billes sont inertes vis-à-vis des microtubules (aucune interaction chimique), on peut alors s'interroger sur les processus qui gouvernent le mouvement des

billes. Il est connu que les microtubules isolés peuvent générer une force de poussée sur des objets inertes [Roberts and Hyams 1979, Hill 1981, Hill and Kirschner 1982]. D'autres mécanismes sont pourtant à envisager, en particulier le fait que des ondes de concentration puisse déplacer des objets inertes. Ceci est connu en physique : des ondes de concentration peuvent déplacer des objets inertes. Dans l'étude qualitative et quantitative qui suit, nous nous attachons à montrer que ce processus est effectivement directement lié à l'auto-organisation des microtubules.

1. Description du mouvement des billes au cours de l'auto-organisation microtubulaire

D'une façon générale, si l'on prépare une solution de tubuline à 10 mg.ml^{-1} avec 2 mM de GTP et des particules comme des billes de polystyrène, et qu'on met cette préparation à assembler en position horizontale sous microscope, on va pouvoir suivre l'auto-organisation des microtubules (en stries concentriques) et les mouvements des particules.

Si la solution s'assemble et s'organise correctement, alors les particules se déplacent dans l'échantillon de façon ordonnée durant le processus d'auto-organisation.

Au début du processus, les microtubules s'assemblent mais les billes ne bougent pas. Après le point de bifurcation du système, aux alentours de la 6^{ème} minute, les microtubules commencent leur auto-organisation et de la biréfringence apparaît. Le mouvement ordonné des billes commence aux alentours de la 10^{ème} minute. Au début, la vitesse des billes est très lente, puis elles accélèrent peu à peu jusqu'à atteindre leur vitesse maximale de l'ordre de $5 \text{ }\mu\text{m.min}^{-1}$ après environ une heure et demi à 37°C. Ensuite les billes ralentissent progressivement et s'arrêtent quand l'auto-organisation est enfin complète (Figure 16).

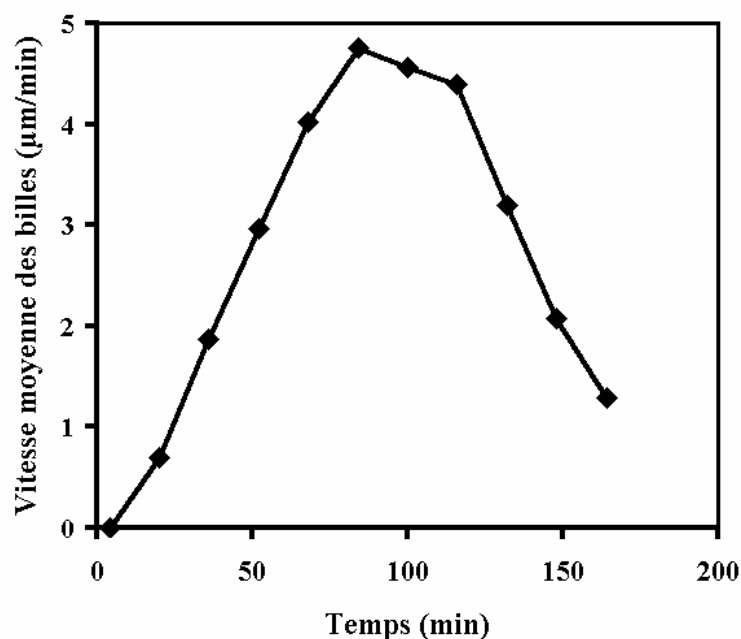


Figure 16. *Évolution de la vitesse moyenne de déplacement d'une bille au cours du temps. La vitesse de la bille augmente progressivement à partir de la 10^{ème} minute et elle est maximale au bout de 1h30. Ensuite, elle diminue lentement pour s'arrêter complètement une fois l'organisation terminée.*

On peut vérifier cela en se mettant dans des conditions telles qu'on n'empêche pas l'assemblage des microtubules mais uniquement leur auto-organisation. En utilisant du Taxol à 45 µM [Tabony et al 2000], une molécule qui stabilise les microtubules formés, on inhibe la formation des structures auto-organisées. De même, si on ajoute aux préparations du magnésium. Le magnésium empêche les microtubules de 'dialoguer' entre eux correctement en augmentant la réactivité des microtubules. Une concentration en magnésium de 10 mM suffit à inhiber complètement l'auto-organisation des microtubules sans empêcher leur assemblage. Dans ces conditions, les billes ne se déplacent pas du tout. Dans un simple tampon ne contenant pas de microtubules, les billes ne se déplacent pas non plus.

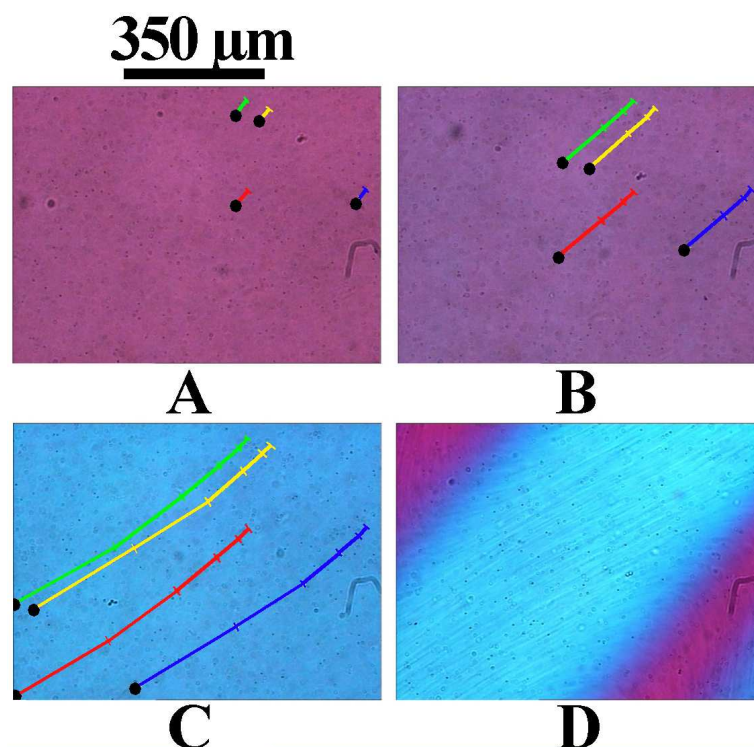


Figure 17. Déplacement de particules colloïdales durant l'auto-organisation des microtubules. Ces photographies ont été prises en biréfringence avec un compensateur de longueur d'onde λ à différents instants au cours du processus d'auto-organisation; (A) à 20 min, (B) à 40 min, (C) à 60 min, (D) à 5 heures. Les nombreux points noirs que l'on peut voir sont des billes de polystyrène de 1 μm de diamètre. Certaines d'entre elles, ainsi que leurs trajectoires, ont été colorées. Durant la première heure de l'auto-organisation, les particules se déplacent dans la même direction, selon l'axe des microtubules. Quand les microtubules se réorganisent, la direction des billes change en conséquence.

Un argument supplémentaire qui sera développé dans le paragraphe B, est que les billes elles-mêmes finissent par s'auto-organiser en un motif strié superposable au motif strié des microtubules. Il est ainsi difficile de concevoir que la formation de ces deux motifs ne soit pas intimement liée.

2. Quelle est l'origine du mouvement ?

Le fait que le mouvement des particules soit lié à l'auto-organisation des microtubules n'en donne pas pour autant le mécanisme. Nous avons donc effectué toute une batterie d'expériences *in vitro*, à la fois pour quantifier le mouvement des particules et pour éliminer un certain nombre d'hypothèses. Cette étude quantitative donne de précieux renseignements quant au mécanisme impliqué.

2.1. L'influence du type de particule, une possibilité d'interaction avec les microtubules?

On peut d'entrée de jeu éliminer l'hypothèse d'une interaction spécifique entre les billes et les microtubules. Tout d'abord les billes de polystyrène sont chimiquement inertes, ensuite le mouvement des particules induit par l'auto-organisation des microtubules ne se limite pas aux billes de polystyrène et fonctionne très bien avec d'autres types de particules comme des particules métalliques de taille semblable [Sigma - b].

2.2. Les déplacements ne sont pas la conséquence de phénomènes de convection

Parmi les mécanismes envisageables, des flux du milieu pourraient naître de phénomènes convectifs et entraîner les particules.

Des expériences antérieures, faites au laboratoire, avaient déjà montré, à l'aide de colorants, que l'auto-organisation n'était pas due à des phénomènes de convection [Tabony and Job 1992-b]. Les solutions de microtubules assemblés sont très visqueuses et rendent difficile l'apparition de phénomènes de convection. Leur viscosité a été mesurée et elle est de l'ordre de 5000 poises [Buxbaum et al 1987].

Une expérience permet toutefois de s'assurer que ce n'est pas le cas en ce qui concerne le mouvement des billes. Un échantillon constitué de deux parties différentes a été préparé. La partie basse de l'échantillon contient de la tubuline à 10mg.ml^{-1} et 2 mM de GTP ; la partie haute de la tubuline à 10mg.ml^{-1} , 2 mM de GTP, des billes en concentration suffisante pour une observation aisée ainsi qu'un traceur fluorescent, $95\ \mu\text{M}$ de rhodamine. La rhodamine est un traceur ne fixant aucun des composants présents dans la solution. Elle sert ici à tracer le milieu, c'est-à-dire le milieu constitué des molécules libres de diffusion.

L'expérience consistait à regarder le comportement des billes au niveau de l'interface entre les deux parties de la cuve décrites précédemment, et de vérifier avec la rhodamine que ni l'auto-organisation, ni d'autres phénomènes comme de la convection, ne donnent lieu à des mouvements du milieu qui induiraient le déplacement des particules.

L'interface a été suivie au microscope en fluorescence pour observer l'évolution des fronts de concentration en rhodamine et en fond noir pour suivre le front de déplacement des billes. Des photographies de l'interface ont été prises en fond noir et en fluorescence rhodamine à partir de la 15^{ème} minute à des intervalles de temps réguliers de 30 minutes.

A la quinzième minute après avoir mis l'échantillon à assembler à 35°C, l'interface est uniforme quelle que soit la méthode d'observation. La répartition des billes est homogène dans la partie haute de l'échantillon. Très rapidement, on observe une déformation de l'interface et peu à peu des invaginations de la partie haute pénètrent dans la partie basse de l'échantillon. Ceci peut être vu en suivant les billes en fond noir. En revanche, le profil de diffusion de la rhodamine reste uniforme, sans présenter d'invagination dans l'interface. Quand la morphologie de l'échantillon est enfin terminée, les invaginations persistent (Figure 18). Ce résultat indique qu'il n'y a pas de flux liquidiens déplaçant les billes dans la solution.

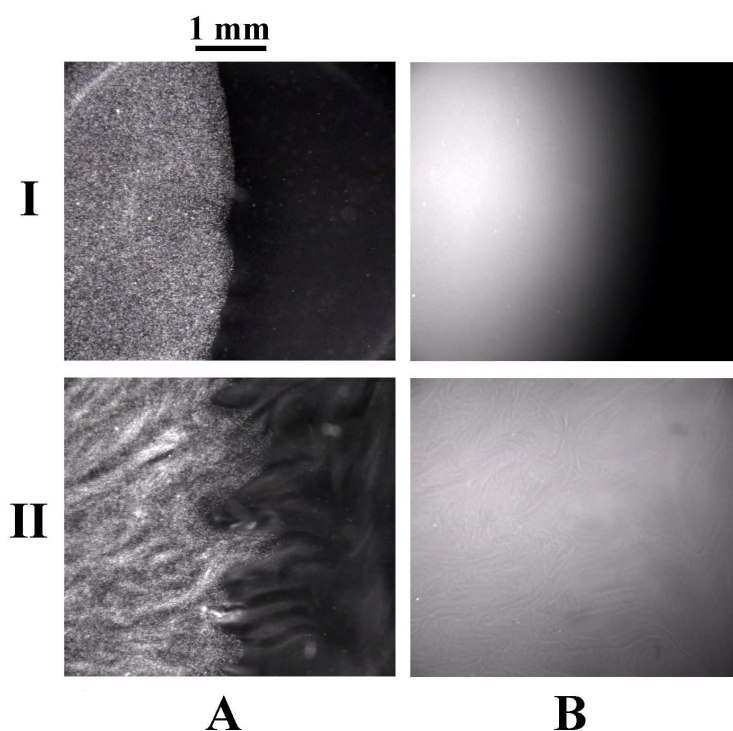


Figure 18. Photographies d'une zone de l'interface réalisée dans une solution de microtubules à 10 mg.ml⁻¹ de tubuline et 2 mM de GTP. La partie gauche de l'interface (haut de la cuve) contient en plus 95 μM de rhodamine et des billes de 1 μm de diamètre. En (A), les photographies faites en fond noir montrent la distribution des billes. En (B), on peut voir le profil de rhodamine vu par fluorescence. Ces photos ont été prises au début (I)(20 minutes) et à la fin (II)(5 heures) de l'auto-organisation. On voit que les billes traversent l'interface selon des invaginations. Par contre, la rhodamine diffuse progressivement depuis l'interface de façon uniforme indiquant que les billes ne se déplacent pas à cause de mouvements liquidiens dus à de la convection.

2.3. Étude quantitative du mouvement des billes de polystyrène

L'enregistrement de la trajectoire des billes au cours du temps permet non seulement de connaître leur direction en fonction des directions des microtubules, mais également de quantifier ce mouvement. Une telle étude indique dans quelle mesure le mouvement des billes est lié à la réactivité de la solution de microtubules et à d'autres facteurs comme le diamètre des particules. La réactivité de la solution peut être changée en utilisant des concentrations différentes de tubuline ; plus la concentration en tubuline est élevée plus la réactivité du système augmente. De même, si on augmente la température dans des limites raisonnables pour un échantillon biologique. Lorsque la réactivité du système est augmentée, les morphologies se développent plus vite et elles ont un aspect très travaillé avec des stries plus resserrées et plus biréfringentes. Au contraire, si on diminue la température ou la concentration de tubuline, l'auto-organisation se fait moins bien et moins rapidement.

Dans les trois types d'expériences suivantes, nous avons tracé la trajectoire d'une trentaine de billes dans chaque échantillon et, pour chaque bille, nous avons mesuré l'évolution de la vitesse instantanée au cours du temps. La moyenne des vitesses des billes ainsi que leur écart type ont été ensuite calculés pour chaque expérience. Chaque expérience a été doublée. De ces données ont été notamment extraits trois types de valeur : la vitesse maximale des billes, l'accélération maximale des billes, et la durée de réaction nécessaire pour que les billes atteignent leur vitesse maximale après le début de la réaction. Ce sont ces deux dernières valeurs qui sont les plus significatives. La vitesse maximale atteinte par les billes, telle qu'elle a été mesurée, est difficile à corrélérer avec les différentes conditions d'expérience.

On peut, nous le verrons, avec de tels résultats se faire une bonne idée sur l'origine du mouvement des particules.

2.3.1. Vitesse des billes en fonction de la température

L'auto-organisation des solutions de microtubules se fait dans les conditions habituelles à 35°C. Cependant elle peut aussi se faire à des températures plus faibles ou plus élevées. A 30°C, l'auto-organisation est moins bonne et très lente, alors qu'elle est beaucoup plus rapide à 40°C. Nous avons réalisé les mesures décrites précédemment à trois températures différentes, c'est-à-dire à 30°C, à 35°C et à 40°C.

Comme on pouvait s'y attendre, un tel changement a une influence importante sur le comportement des particules. Le maximum de vitesse est d'autant plus vite atteint que la

température est élevée : de presque 4 heures à 30°C pour atteindre la vitesse maximale de déplacement, on passe à 1 h 40 à 35°C et à 40 minutes quand on est à 40°C. Cela est en accord avec le fait que la durée nécessaire à l'auto-organisation des échantillons est fortement diminuée avec l'augmentation de la température. De plus, la vitesse maximale qu'atteignent les billes est multipliée par un facteur d'environ 20 fois entre 30°C et 40°C. Cependant, ce maximum n'augmente pas fortement entre 35°C et 40°C. Ceci est visiblement dû au fait que la vitesse maximale est très vite atteinte à 40°C, avec une très forte accélération dès le début de la réaction. De ce fait, il est plus intéressant de regarder la vitesse qu'ont les billes à un moment fixe pour les trois cas différents. Nous avons mesuré les vitesses des billes durant leur phase d'accélération, c'est-à-dire après 40 minutes. Dans ce cas, on voit que la vitesse des billes augmente fortement avec la température, puisqu'on passe de 0.1 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ à 30°C à 7 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ à 40°C.

Ces résultats concordent avec le fait qu'une augmentation de la température augmente la réactivité du système que l'on peut associer avec la consommation d'énergie chimique (dans notre cas, le GTP) dans la solution de microtubules [Tabony 1994].

TABLE 1. Vitesse du mouvement de billes en polystyrène de 1 μm de diamètre après 40 minutes ; Durée de la réaction nécessaire pour atteindre la vitesse maximale des billes ; Accélération des billes ; en fonction de la température d'assemblage des microtubules ou de la réactivité (consommation de GTP mesurée par RMN [Tabony 1994]) pour une concentration en tubuline de 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Température °C	30	35	40
Vitesse des particules après 40 minutes ($\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.1	3	7
Durée jusqu'au maximum de vitesse (min)	220	100	40
Accélération des billes ($\text{nm}\cdot\text{min}^{-2}$)	1	75	176
Vitesse de consommation du GTP ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	8	16	-

2.3.2. Influence de la concentration en tubuline sur la vitesse des billes.

La réactivité de la solution de microtubules augmente aussi avec la concentration initiale de tubuline, comme cela peut être encore une fois montré en suivant la consommation

d'énergie chimique (Communication privée (e)). L'auto-organisation est meilleure et plus rapide pour des concentrations élevées de tubuline.

Dans cette expérience, le comportement des particules est analogue à celui de l'expérience précédente. Ainsi, la vitesse des particules est multipliée par 7 entre 6 mg.ml^{-1} et 22 mg.ml^{-1} . De plus, lorsqu'on passe d'une concentration de 6 mg.ml^{-1} à 22 mg.ml^{-1} , la durée nécessaire pour atteindre la vitesse maximale des billes passe de 2 h à 50 minutes seulement.

Augmenter la concentration en tubuline aboutit au même résultat qu'une augmentation de la température. Dans les deux cas, cela provoque une augmentation de la réactivité.

TABLE 2. Vitesse du mouvement de billes en polystyrène de $1 \mu\text{m}$ de diamètre après 40 minutes ; Durée de la réaction nécessaire pour atteindre la vitesse maximale des billes ; Accélération des billes ; en fonction de la concentration en ou de la réactivité (consommation de GTP mesurée par RMN (Communication privée (e))) pour une température d'assemblage de 35°C .

Concentration en tubuline (mg ml^{-1})	6	10	14	22
Vitesse des particules après 40 minutes ($\mu\text{m min}^{-1}$)	1	3	6	7.1
Durée jusqu'au maximum de vitesse (min)	120	100	63	50
Accélération des billes (nm.min^{-2})	22	75	150	177
Vitesse de consommation du GTP ($\mu\text{M min}^{-1}$)	11	16	23	51

2.3.3. Influence du diamètre des billes.

La réactivité des solutions de microtubules, en terme de consommation du GTP, est un reflet de l'ensemble des réactions de consommation de la tubuline, à savoir l'assemblage de la tubuline sous forme de microtubules, en particulier durant leur élongation. Étant donné que le mouvement des particules est lié à la réactivité du système et qu'il se fait dans la même direction que les microtubules, on est en droit de supposer qu'il est induit par la poussée directe des microtubules en croissance sur les billes. Les microtubules sont effectivement capables d'exercer une forte poussée sur des objets inertes [Roberts and Hyams 1979, Hill 1981, Hill and Kirschner 1982]. Selon une telle hypothèse, les caractéristiques quantitatives du mouvement des particules devraient donc changer en fonction de leur diamètre : plus les

particules ont un diamètre élevé, plus la surface exposée aux microtubules est élevée, donc, dans ce cas, le nombre de microtubules pouvant y exercer une poussée, augmente.

TABLE 3. Vitesse du mouvement de billes en polystyrène après 40 minutes ; Durée de la réaction nécessaire pour atteindre la vitesse maximale des billes ; Accélération des billes ; en fonction du diamètre de ces particules pour concentration de tubuline de 10 mg.ml^{-1} et une température d'assemblage de 35°C .

Diamètre des particules (μm)	0.8	1.1	3.2	6.4
Vitesse des particules après 40 minutes ($\mu\text{m min}^{-1}$)	2	3	2	2.4
Durée jusqu'au maximum de vitesse (min)	100	100	115	110
Accélération des billes (nm.min^{-2})	51	75	48	61

Tel n'est pas le cas comme on peut le voir dans la table 3. Les valeurs obtenues sont du même ordre pour les quatre diamètres de billes. Pour s'en assurer nous avons mélangé des billes de diamètres différents dans une même solution (une solution contenant à la fois des billes de $1.1 \mu\text{m}$ [Sigma - d] et des billes de $6.4 \mu\text{m}$ [Sigma - f] et une solution contenant des billes de $0.8 \mu\text{m}$ [Sigma - a] et des billes de $3.2 \mu\text{m}$ [Sigma - e]). Les quatre types de billes se sont comportés de la même façon (courbes de vitesse non différentiables).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, il est donc peu probable que ce soit la poussée directe des microtubules qui provoque le mouvement des billes. L'explication du mouvement des particules se trouve, nous le verrons par la suite, probablement dans l'existence d'ondes de densité se déplaçant au sein de la solution.

B. L'auto-organisation des microtubules provoque l'ordonnement des billes.

Au cours des expériences visant à déterminer l'origine du mouvement des billes, il nous a semblé qu'une fois le processus d'auto-organisation terminé, la distribution des billes n'était plus homogène. Nous avons vérifié cette observation qui avait été faite premièrement en simple lumière transmise par d'autres méthodes, comme la microscopie en fond noir ou en utilisant des billes fluorescentes (cf. Annexe 2). Nous avons pu montrer que les billes, une fois l'auto-organisation terminée, formaient une morphologie striée superposable au motif microtubulaire strié. De plus, comme pour les microtubules, la morphologie observée pour les billes comportait plusieurs niveaux de striation (Figure 19).

Pour cette expérience, nous avons utilisé, comme pour les expériences précédentes, des solutions de tubuline à 10 mg.ml^{-1} avec 2 mM de GTP. Nous y avons ajouté des billes fluorescentes de $1 \mu\text{m}$, ré-émettant à 610 nm, c'est-à-dire dans la longueur d'onde des filtres utilisés pour la Rhodamine (rouge). Par fluorescence, chacune des billes en solution peut être observée et on n'observe que les billes, contrairement aux observations que l'on fait habituellement en biréfringence où l'on distingue les billes parmi les stries de microtubules.

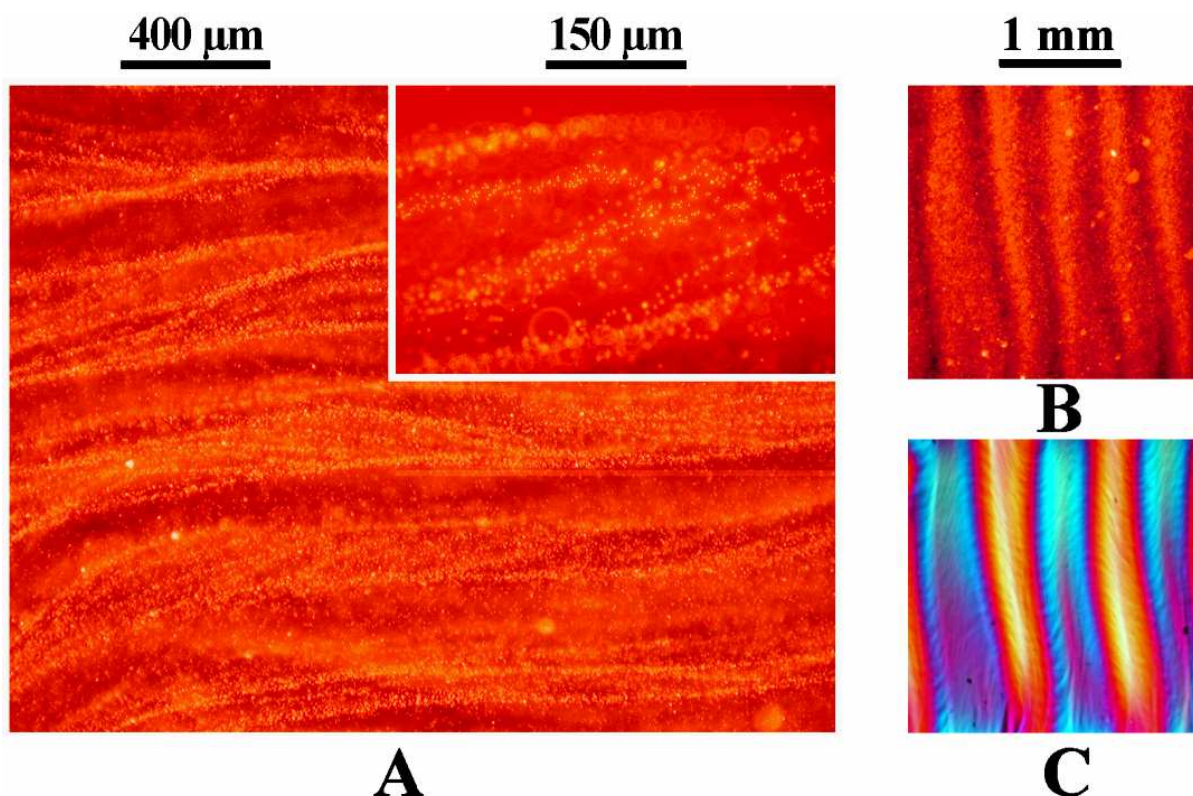


Figure 19. L'auto-organisation des billes de polystyrène se fait dans les solutions de microtubules auto-organisés. La photographie suivante prise en fluorescence (A) montre la distribution de billes fluorescentes de $1 \mu\text{m}$ de diamètre à deux grossissements ($2.5x$ et $32x$ (encart)). Les stries de billes vues en fluorescence (B) concordent avec les stries de microtubules vues en biréfringence avec λ (C).

Pour lever tout doute possible, nous avons fait une expérience supplémentaire. Dans un premier temps, la solution non assemblée, tout juste sortie de la glace, a été observée en fluorescence. Comme attendu, la distribution des billes était homogène. Ensuite, l'échantillon a été observé une fois le processus d'auto-organisation terminé à 37°C . Des stries microtubulaires et des stries de billes étaient bien visibles, respectivement en polarisation croisée et en fluorescence DAPI pour les microtubules et en fluorescence 'Rhodamine' pour

les billes. L'échantillon a alors été placé à 4°C pour faire désassembler les microtubules. Après une heure, l'échantillon a été observé en biréfringence, en fluorescence DAPI et en fluorescence Rhodamine. Aucune trace des microtubules n'était observable, l'exposition d'une heure à 4°C les ayant fait complètement désassembler. En revanche les stries de billes fluorescentes étaient encore bien visibles, les billes n'ayant eu beaucoup le temps de se déplacer par agitation thermique dans la solution.

La preuve que le mouvement des particules est directement lié à l'auto-organisation des microtubules n'est plus à faire, cependant il est difficile de se faire une idée quant au mécanisme exact qui permet à la fois le mouvement des billes et leur ségrégation sous forme de stries. Une déformation mécanique de la solution gélifiée de microtubules pourrait bien sûr expliquer simplement le déplacement de particules immobilisées dans ce gel, mais en aucun cas cela ne permettrait d'expliquer le fait que d'une répartition initialement uniforme on aboutisse à la fin du processus à une distribution des particules qui n'est plus aléatoire mais sous forme de stries.

Pour qu'il y ait une forte concentration en billes à certains endroits et une déplétion à d'autres, il faut que les billes se déplacent de façon différente selon l'endroit où elles se trouvent dans la solution. Une accumulation des billes sous forme de stries ne peut provenir que de leur mouvement différentiel. Cela est inévitablement lié à la réactivité adaptative des microtubules.

Nous l'avons vu précédemment, même si l'hypothèse est séduisante, il ne semble pas que ce soit la poussée des microtubules par contact direct qui provoque le déplacement différentiel des particules, car des billes de dimensions différentes se déplacent à la même vitesse moyenne.

Au vu de toutes ces observations et après élimination des autres hypothèses concernant ce processus, il est fort probable que ce soit la formation progressive d'ondes de viscosité ou d'ondes de densité qui est à l'origine du mouvement et de l'auto-organisation des billes de polystyrène. Au cours de l'auto-organisation, il se forme progressivement des inhomogénéités de densité dans la solution, correspondant aux stries de microtubules. Ces différences de densité sont équivalentes à des différences de viscosité. En effet, les différences de densité sont essentiellement dues aux microtubules très denses. Au cours de l'auto-organisation, la formation et le réarrangement des stries microtubulaires accompagnent la réorganisation des microtubules. Sous biréfringence, on observe facilement le réarrangement des stries. On voit notamment les stries se resserrer peu à peu. Cela signifie que des ondes de densité et de

viscosité se déplacent dans la solution, pouvant entraîner le mouvement différentiel des particules qui s'y trouvent. Les particules se déplacent plus vite dans les zones les moins visqueuses alors qu'elles sont ralenties dans les zones à forte teneur en microtubules. Il en résulte une accumulation des particules dans les zones contenant le plus de microtubules. C'est effectivement ce qui est observé expérimentalement quand on suit, à la fois l'évolution des microtubules marqués en fluorescence DAPI, et celle des billes en fluorescence rhodamine (cf. Annexe 2.4).

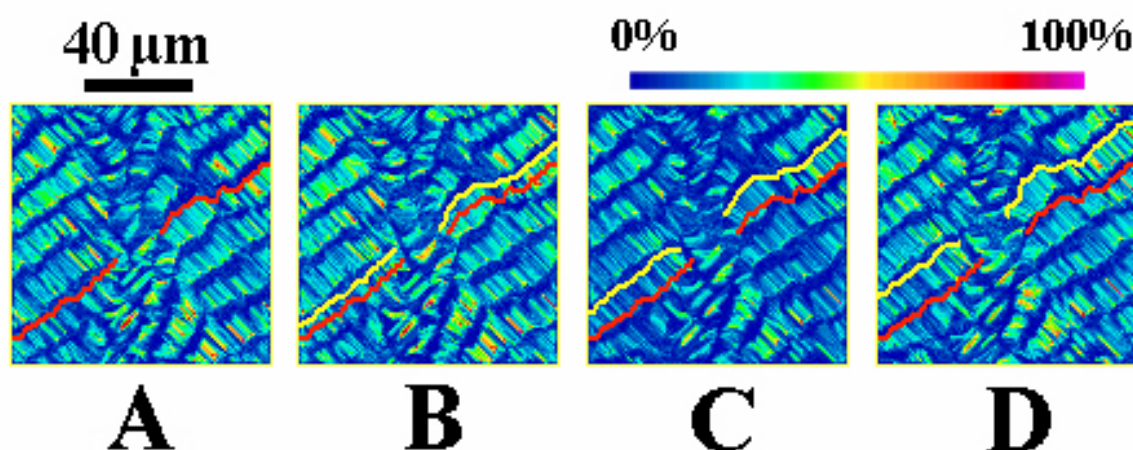


Figure 20. Ondes de densités se déplaçant dans une population de microtubules simulés. Cette figure montre le résultat d'une simulation numérique, d'une population de microtubules évoluant dans un espace de réaction de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ après 2 heures de temps de réaction simulé. Les 4 images (A, B, C, D) sont prises à 2 minutes d'intervalle. L'échelle de couleur représente la concentration en microtubules. Au cours du processus, des regroupements de microtubules alignés apparaissent sous forme de stries. Les microtubules sont tous orientés dans le même sens de croissance dans ces stries. Ces dernières se déplacent comme des vagues, selon un front collectif, à une vitesse de $4 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$. La ligne jaune indique la position d'un de ces fronts avançant au cours du temps, la référence étant la ligne rouge marquant la position du front sur la première image.

En parallèle des expériences, les simulations numériques obtenues avec notre modèle d'auto-organisation des microtubules nous ont livré un résultat saisissant. Les résultats des simulations numériques montrent la formation d'inhomogénéités de densité et leur réarrangement progressif en zones striées, au cours de l'auto-organisation des microtubules. Quand les inhomogénéités présentes dans la solution simulée commencent à se reformer en stries, elles se déplacent de façon coordonnée à une vitesse de l'ordre de $5 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$. Dans ces zones striées, les microtubules sont disposés de façon parallèle, perpendiculairement au grand

axe des stries, et se déplacent de façon synchronisée selon un front d'onde régulier (Figure 20). Cette observation, faite sur les résultats des simulations numériques, suggère fortement que le mouvement, ainsi que l'organisation des particules, est bien du à leur déplacement différentiel lié à la formation, au réarrangement et au déplacement d'inhomogénéités spatiales de concentration dans les préparations de microtubules.

C. Conclusions des expériences sur le mouvement des particules

Nous avons clairement montré que le mouvement de particules subcellulaires est directement associé à l'auto-organisation dans des solutions de microtubules *in vitro* ne contenant pas de moteurs moléculaires. Nous avons aussi montré que ces particules, disposées d'une façon initialement homogène dans la solution, se répartissaient finement et d'une façon non aléatoire sous forme de stries corrélées au motif microtubulaire. Ce phénomène est également directement lié à l'auto-organisation des microtubules.

N'étant pas à la place d'une de ces particules, il est difficile de conclure précisément quant à un mécanisme. Cependant, L'ensemble de nos observations et mesures expérimentales, ainsi que les résultats des simulations numériques, concordent parfaitement pour expliquer ces phénomènes en faisant intervenir des ondes de densité ou de viscosité présentes dans la solution sous formes d'ondes de concentrations en microtubules. Ces ondes, en se déplaçant de façon ordonnée, pourraient induire le déplacement des particules et leur organisation progressive. Les simulations concordent avec ceci de façon qualitative (déplacement d'ondes de concentration en microtubules) et quantitative (vitesses de déplacement), à ceci près que, *In vitro*, les billes ne bougent plus quand l'auto-organisation des microtubules est terminée; en simulation, nous ne sommes pas encore parvenus à obtenir de structure spatiale composée de stries stationnaires. Expérimentalement, des ondes de concentration en microtubules se déplaçant à grande vitesse (environ $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$) ont été observées par l'équipe de Mandelkow [Mandelkow et al 1989] dans des solutions de microtubules présentant des oscillations spatio-temporelles de la concentration en microtubules. Les conditions qui permettent ces oscillations spatio-temporelles sont proches de celles que nous utilisons pour obtenir l'auto-organisation des microtubules.

Un tel mécanisme constitue un nouveau moyen pour convertir efficacement de l'énergie chimique (ici sous forme de GTP) en mouvement, dans un système biologique. Le

métabolisme cellulaire repose en très grande partie sur le transport de matériel biologique, stocké en général dans des vésicules lipidiques, d'un endroit à l'autre et de façon ordonnée dans la cellule. Ce type de transport est particulièrement vital dans les cellules de grande taille comme les neurones ou les cellules végétales, cellules ne pouvant assurer la distribution des métabolites entre les différents compartiments cellulaires uniquement par diffusion comme c'est le cas dans les bactéries ou les petites cellules animales. Le mécanisme que nous avons mis à jour pourrait bien constituer un mécanisme fondamental pour les mouvements internes dans les cellules, l'apport de systèmes spécialisés, comme les moteurs moléculaires, permettant un contrôle plus fin du transport des particules.

Des éléments tendent à montrer qu'une telle affirmation n'est pas déraisonnable [Alberts et al 1983]. Tout d'abord, les vitesses de déplacements des vésicules dans les cellules sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons mesurées dans notre système *in vitro*. Dans les neurones par exemple, le transport axonal des vésicules se fait à des vitesses comprises entre 100 et 300 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, pour les transports les plus rapides, et, entre 1 et 5 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, pour les transports les plus lents. Par ailleurs, dans les cellules végétales, les microtubules permettent de disposer de façon ordonnée des vésicules issues de l'appareil de golgi, le long d'un plan qui constitue la future séparation entre les deux cellules filles, lors de la division cellulaire. Les vésicules se déplacent selon l'axe des microtubules, parallèles aux microtubules du fuseau mitotique et répartis de part et d'autre perpendiculairement à ce plan. L'accumulation des vésicules golgiennes en cet endroit va amener à la formation de ce que l'on appelle la plaque cellulaire. Cette dernière s'étend ensuite peu à peu par addition de nouvelles vésicules apportées par de nouveaux microtubules qui s'assemblent à la périphérie alors que les microtubules les plus centraux se dissocient. Cet exemple de transport organisé dans les cellules végétales fait partie de ce que l'on appelle le 'cytoplasmic streaming', ou courant cytoplasmique, et qui décrit l'agitation très importante du cytoplasme de ces cellules à cause de la circulation des matériaux.

Autorisons-nous une vision un peu osée de ce mécanisme transposé dans les cellules vivantes : nous savons que ce phénomène est déjà très consommateur d'énergie puisqu'il nécessite entre autre l'assemblage et la maintenance des microtubules. Un système comprenant en plus des systèmes spécialisés, comme les moteurs moléculaires, devient extrêmement gourmand en énergie, ces derniers nécessitant de grandes quantités d'Adénosine TriPhosphate (ATP) pour leurs déplacements sur le cytosquelette. Sans rejeter l'existence ni l'efficacité des moteurs moléculaires, on peut penser qu'une cellule a le moyen de faire une économie considérable d'énergie en utilisant, au maximum, la potentialité offerte par le

mécanisme fondamental que nous décrivons. On est droit de supposer que si l'évolution tend vers l'amélioration des organismes, souvent par une spécialisation des processus, elle aura tout de même tendance à choisir entre deux systèmes vivants de résultat équivalent, le plus économe des deux. Cette remarque est bien entendue valable pour l'ensemble des autres processus que le transport intracellulaire, comme par exemple la ségrégation des chromosomes ou l'organisation du cytosquelette à l'intérieur des cellules.

Chapitre 2 - Effet des champs externes faibles sur l'auto-organisation des microtubules

Buffon, dans *l'Histoire naturelle générale et particulière*, écrivait, je cite "il est évident que ni la circulation du sang, ni le mouvement des muscles, ni les fonctions animales ne peuvent s'expliquer par l'impulsion, ni par les autres loix de la mécanique ordinaire, il est tout aussi évident que la nutrition, le développement & la reproduction se font par d'autres loix; pourquoi donc ne veut-on pas admettre des forces pénétrantes & agissantes sur les masses des corps, puisque d'ailleurs nous en avons des exemples dans la pesanteur des corps, dans les attractions magnétiques, dans les affinités chimiques [...] ?" [Buffon (e)]

Dans ce court paragraphe, Buffon affirme son intuition quant à l'influence des champs externes, comme la gravité ou les champs magnétiques, sur les systèmes vivants, bien qu'il ne l'ait pas lui-même vérifiée expérimentalement. Depuis, nous savons effectivement par l'expérimentation que de tels champs agissent sur les organismes, en particulier la gravité. Une constatation s'impose quand on observe l'état de santé des astronautes en mission dans l'espace. Depuis au moins vingt ans, on sait que les séjours dans l'espace provoquent une forte diminution d'efficacité du système immunitaire (voir par exemple Cogoli-Greuter et al 1998, Lewis et al 1998), un vieillissement accéléré des cellules, et enfin une nette perte musculaire et osseuse (voir par exemple LeBlanc et al 1998). Une explication possible de ces deux derniers symptômes, serait l'absence des appuis mécaniques qu'ils auraient sur terre. Cependant, les exercices auxquels ils sont soumis, pour palier à ces symptômes, sont loin de suffire pour rétablir un fonctionnement physiologique. De plus, cela n'expliquerait en rien les problèmes liés au vieillissement cellulaire et le système immunitaire déficient. Des expériences d'apesanteur ont été faites sur des cultures cellulaires d'origine immunitaire ou osseuse. Ces expériences ont souligné l'origine cellulaire des dysfonctionnements liés à l'apesanteur dans les organismes vivants.

Des expériences anciennes, faites sur des embryons d'amphibiens, ont montré que lorsque l'on change le sens de l'échantillon par rapport à la direction de la gravité, et ce, à un moment précis du développement, ces derniers sont malformés et ne se développent pas (voir par exemple Cleine and Dixon 1985). Cet instant, durant lequel les embryons sont sensibles leur orientation par rapport à la direction de la gravité, coïncide avec la formation du

'croissant gris', correspondant au pôle animal de l'embryon, c'est-à-dire au moment de la gastrulation. C'est à cet instant précis que si l'on modifie les conditions d'exposition de l'œuf vis-à-vis de la direction de la gravité, on peut faire bifurquer son développement vers d'autres morphologies, en général létales pour l'embryon.

Actuellement, il n'existe pas d'explication cohérente de ces observations expérimentales faites sur des systèmes vivants. Les mécanismes de transduction de la gravité à l'intérieur des cellules, et qui plus est les molécules impliquées dans cette transduction, ne sont pas connus.

Les solutions de microtubules assemblés *in vitro* sont fortement sensibles à la présence de ces champs externes. Ce système possède des propriétés de bifurcation [Tabony 1994, Tabony 1996-b]. Son organisation dépend de son orientation par rapport à la gravité [Tabony and Job 1992-b]. La gravité déclenche l'auto-organisation de la solution à un moment critique, précoce dans le processus. Des solutions microtubulaires assemblées en apesanteur, durant une expérience embarquée dans un vol spatial de 15 minutes, ne se sont pas auto-organisées contrairement aux solutions témoins qui se sont développés dans une centrifugeuse 1g embarquée [Papaseit et al 2000] (cf. Généralités sur les microtubules, Section 2.2). Le fait que les solutions auto-organisées de microtubules soient sensibles à l'action de la gravité à un moment critique du processus réactif, suggère fortement que les microtubules puissent constituer un excellent moyen de transduction de la gravité dans les cellules vivantes.

Suite à ces résultats, des études récentes ont effectivement montré que le cytosquelette se désorganisait en apesanteur et que ceci avait pour conséquences certains dysfonctionnements cellulaires. Ainsi, l'équipe de J. Vassy a pu observer une complète désorganisation du réseau de microtubules dans des cellules épithéliales MCF-7 [Vassy et al 2001]. Les centrioles, centre organisateurs du cytosquelette sont également mal positionnés dans des cellules lymphatiques en apesanteur. Enfin, il a été montré récemment que des dysfonctionnements de transduction du signal immun dans des cellules immunitaires étaient liés à une désorganisation du cytosquelette.

Parallèlement des études ont montré que les microtubules étaient impliqués dans l'effet des champs magnétiques *in vivo* [Denegre et al 1998]. Les microtubules, structures fibrillaires sont magnétiquement anisotropes et peuvent s'orienter sous l'effet d'un champ magnétique [Vassilev et al 1982, Bras et al 1998].

Ces observations, faites dans des cellules vivantes, concordent avec nos observations expérimentales. Tous ces points s'accordent pour faire des microtubules, des récepteurs et transducteurs des champs externes faibles.

Les raisons poussant à s'intéresser aux effets des champs externes sur les organismes vivants sont nombreuses. Le monde actuel baigne dans les champs magnétiques et électromagnétiques (portables, lignes à haute tension, radars) et, peu à peu, les missions spatiales, actuellement en projet, vont exposer les organismes à de longues périodes d'apesanteur. Comprendre quels sont les vecteurs et quels sont les processus sous-jacents à cette sensibilité devient donc un problème biologique important.

Dans ce chapitre qui clos la partie expérimentale, nous nous attachons donc à montrer de façon qualitative, mais également quand c'est possible, de façon quantitative, les effets liés à la présence ou à l'absence de champs externes faibles tels que la gravité ou les champs magnétiques. Nous montrons dans quelle mesure, ces effets liés à des champs externes ou encore à des stress mécaniques, peuvent induire une bifurcation du système et le guider vers l'une ou l'autre des morphologies possibles.

Une solution efficace pour étudier l'effet d'un champ externe sur un système consiste, dans un premier temps, à annuler son effet pour connaître le devenir du système sans sa dépendance vis-à-vis du champ. Des expériences dans ce sens ont été faites dans l'espace mais elles sont très lourdes à mettre en œuvre, longues dans la durée et très coûteuses. Il existe d'autres possibilités pour étudier les effets de l'apesanteur. Elles consistent à la simuler sur terre. Ces possibilités comprennent l'utilisation de clinostats, de machines à chute libre, mais aussi la lévitation magnétique dans un aimant de très forte intensité. Nous avons donc voulu savoir si ces méthodes marchaient. Nous montrons que si les expériences sont faites avec beaucoup d'attention, on obtient dans un clinostat des résultats identiques à ceux qui peuvent être obtenus lors d'un vol spatial. Ceci est important car ces expériences sont simples à mettre en œuvre et très peu coûteuse, puisqu'elles sont réalisées au laboratoire, l'avantage est que l'on peut les répéter aisément et surtout mieux étudier les phénomènes qui ont lieu. Les expériences en lévitation magnétiques sont plus complexes à mettre en œuvre et plus difficiles à interpréter, mais elles ont aussi permis de ralentir, voire d'empêcher l'auto-organisation des microtubules.

Nous avons obtenu d'excellents résultats dans les clinostat et en lévitation magnétique. Nous montrons que l'on peut empêcher complètement l'auto-organisation de se faire avec ce matériel et que, même dans un clinostat mal réglé, si l'auto-organisation fini par se faire, elle est quand même fortement ralentie. Le fait que l'auto-organisation se soit quand même produite lors de certaines expériences a été très instructif, car, étant à la limite de l'auto-organisation, cela nous a permis d'en déterminer les causes. Dans certains cas nous avons pu

déterminer les seuils d'intensité des champs externes permettant de déclencher l'auto-organisation. Dans d'autres, l'auto-organisation était liée à d'autres sources de rupture de symétrie : nous avons montré que la géométrie des conteneurs était un facteur déclenchant, mais également qu'un cisaillement dû, par exemple, à une bulle d'air traversant l'échantillon, provoquait l'auto-organisation sur sa trajectoire, orientant quelques microtubules, de la même façon qu'un champ magnétique intense déclenche l'organisation en orientant les microtubules. Ces observations ont amplement étayé notre compréhension de l'auto-organisation au niveau microscopique et ont dirigé l'élaboration de notre modèle d'auto-organisation.

Quand nous avons réussi à lever la dépendance des solutions de microtubule vis-à-vis de la gravité, nous avons pu étudier l'effet d'autres champs externes dans le déclenchement de l'auto-organisation. Nous avons ainsi montré qu'il était possible de déclencher l'auto-organisation en utilisant d'autres perturbations que la gravité, dans des échantillons assemblés en apesanteur simulée.

A. Expériences en gravité réduite. Simulation d'apesanteur au sol et lévitation magnétique

Dans une première série d'expériences, nous avons essayé d'enlever l'effet de la gravité de manière à empêcher l'apparition de morphologies auto-organisées et nous avons cherché dans quelles conditions nous pouvions y parvenir. Ceci nous a permis, en particulier, de déterminer quels sont les seuils d'intensité des champs à partir desquels nous avons pu bloquer l'auto-organisation.

Pour simuler l'apesanteur sur terre, il existe trois possibilités : la chute libre qu'on peut pratiquer soit dans les vols paraboliques, malheureusement limités à de courtes périodes de 20 secondes d'apesanteur, soit dans des machines à cycles de chute libre ; les clinostat qui, en faisant tourner l'échantillon sur lui-même, permettent de moyenniser le vecteur gravité à une valeur proche de zéro ; et enfin la lévitation magnétique réalisable dans les aimants de forte puissance et pouvant générer de forts gradients qui peuvent contrebalancer la gravité.

1. Simulation d'apesanteur au sol

Le laboratoire d'A. Cogoli à l'ETH de Zurich, dispose de moyens techniques permettant d'approcher des conditions de micro-apesanteur. Trois machines y sont disponibles :

la machine à chute libre (Free Fall Machine), la machine à positionnement aléatoire ou clinostat 3D (Random Positioning Machine), et un clinostat 2D. Suite à ces expériences à Zurich, nous avons pu disposer au laboratoire d'un clinostat 2D que nous avons placé en chambre chaude régulée à 37°C et dans lequel nous avons pu compléter nos expériences.

Nous avons effectué deux types d'expériences. Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si ces machines étaient capables de reproduire des conditions d'apesanteur suffisantes pour empêcher l'auto-organisation des solutions de microtubules, comme c'était le cas lors de l'expérience embarquée dans la fusée sonde [Papaseit et al 2000]. Nous avons donc placé des solutions de microtubules (Pour la préparation, cf. Annexes 1 et 3) dans ces 3 machines à simuler l'apesanteur, en utilisant les mêmes cuves en verres et les mêmes porte-échantillons que ceux qui ont servi lors de l'expérience dans l'espace. Les conteneurs utilisés étaient les suivants : cuves rectangulaires de 40 x 10 x 1 mm ou 20 x 10 x 1mm, cuves de forme cylindrique à bout arrondi, de 5 mm de diamètre et de 1,5 cm de long (ces cuves étaient initialement fabriquées pour mimer la forme des œufs de drosophile [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Par commodité ils ont été nommés 'œufs de verre'), et microcuves de 40 x 10 x 0.17 mm. De plus, pour des raisons qui seront expliquées plus tard dans le texte, nous avons également réalisé ces expériences dans des tubes de 4 mm de diamètre interne utilisés en résonance magnétique nucléaire (RMN), remplis de 1 ml de solution de tubuline. Nous les avons mis à assembler à 37°C, le clinostat et la RPM en chambre chaude, la FFM étant efficacement régulée en température. Une fois sortis des machines, les échantillons étaient placés à 37°C en chambre chaude et régulièrement photographiés (cf. Annexe 2.5).

Bien entendu, pour chaque expérience, nous avons fait des témoins dans les mêmes conditions, machine arrêtée, et avec les mêmes préparations de tubuline.

1.1. Expériences dans la 'Free Fall Machine' (FFM)

La FFM [Mesland et al 1996, Schwarzenberg et al 1998] se présente comme une colonne d'environ 2 m sur laquelle est fixé un porte-échantillons mobile. En fonctionnement, le porte-échantillons chute à une accélération de 1 g, jusqu'en bas de la colonne, pendant 800 à 900 ms, puis est propulsé à grande vitesse (accélération de 20 g environ) jusqu'au sommet de la colonne, pendant 20 à 80 ms. Un cycle, alternant des phases très rapides d'accélération vers le haut à 20 g et des phases "lentes" de chute libre à 1 g, est donc sensé procurer

suffisamment d'impesanteur à l'échantillon durant l'expérience, la gravité résiduelle étant quasiment nulle durant les phases de chutes.

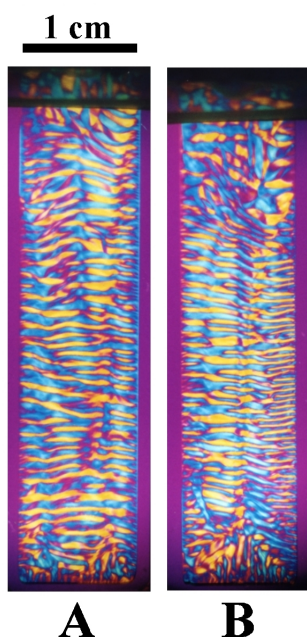


Figure 21. Morphologie microtubulaire auto-organisée obtenues par assemblage dans la 'free fall machine' (A) et son témoin à 1 g (B). Les photographies sont prises en polarisation croisée avec un compensateur λ . Aucune différence n'a été observée. La réduction de gravité produite dans la FFM ne suffit pas à empêcher l'auto-organisation.

Malheureusement, nous avons pu vérifier que ce procédé ne modifiait en rien le processus d'auto-organisation. Après avoir fait 2 témoins dans la FFM à l'arrêt, nous avons mis 2 échantillons à assembler, FFM en marche, pendant 30 minutes. Leur comparaison avec les témoins montre que la vitesse de développement des morphologies, ainsi que les morphologies finales, ne sont pas différenciables (Figure 21).

1.2. Expériences dans la 'Random Positioning Machine' (RPM)

Son fonctionnement est fondé sur celui d'un clinostat 2D. Le principe d'un clinostat est de faire tourner un objet sur lui-même, la vitesse de rotation étant constante est relativement faible (de l'ordre de 1 rotation par seconde) [Cogoli et al 1980, Cogoli and Gmünder 1991]. La rotation de l'objet sur lui-même permet de moyenniser l'intensité de la gravité à une valeur proche de zéro. Au cours du temps, la position de l'objet (au centre du dispositif) ne change pas, mais sa "direction de chute" varie en permanence. C'est comme si cet objet chutait vers le bas à l'instant t , et vers le haut à l'instant $t+1$.

A la différence d'un clinostat 2D classique, la RPM [Schwarzenberg et al 1998] moyenne à 0 g, le vecteur gravité d'un point situé au centre d'un plateau se mouvant aléatoirement autour des 3 axes (x,y,z), comme un gyroscope. Pour un objet ponctuel bien au

centre de la RPM, en rotation à la vitesse maximale de $60^\circ/\text{s}$, la valeur du 'g résiduel' (obtenue par intégration des valeurs effectives de g au cours du temps) est de $3 \cdot 10^{-2}$ g, soit 33 fois moins que la gravité terrestre [Cogoli et al 1980]. A $180^\circ/\text{s}$, cette valeur devient $2 \cdot 10^{-2}$ g (50 fois moins), et à $360^\circ/\text{s}$, elle est de 10^{-2} g (100 fois moins). Il est normal qu'en augmentant la vitesse de rotation on diminue l'intensité du vecteur gravité, car la "direction de chute" augmente en conséquence. On reste certes éloigné des valeurs de 'g' obtenues lors d'un vol spatial ($2 \cdot 10^{-4}$ g), néanmoins, nous verrons que, si nous n'avons pas obtenu de résultats identiques à ceux du vol en apesanteur dans la RPM, ils n'en étaient pas moins instructifs.

Un point important est à souligner : contrairement à un échantillon en vol spatial, l'intensité du vecteur gravité résiduel n'est pas homogène dans tout l'échantillon dans une RPM ou dans un clinostat. En effet, si le point situé au centre des 3 axes ne subit que l'accélération résiduelle, il faut ajouter à cela une accélération provenant de la force centrifuge dès que l'on s'éloigne du centre (cf. Annexe 4). Par exemple, à $360^\circ/\text{s}$ et à 1 cm du centre, il faut ajouter un 'g centrifuge' de $4 \cdot 10^{-2}$ g, alors qu'il n'est que de $4 \cdot 10^{-4}$ g à $60^\circ/\text{s}$ et le double à 2 cm du centre. Le choix d'une vitesse de rotation est donc un compromis entre la valeur du 'g résiduel' au centre et celle des 'g centrifuges' augmentant à l'inverse du premier. Nous verrons que pour la RPM, la valeur optimale testée est de $60^\circ/\text{s}$ et pour le Clinostat 2D, de $360^\circ/\text{s}$.

1.2.1. Absence du mélange des liquides dans une cuve en rotation et arrêt de la convection

Bien que les cuves aient été exemptes d'air, on pouvait se demander si la rotation de la cuve ne risquait pas de provoquer le brassage de la solution de microtubules, alors qu'elle n'était encore que peu assemblée et peu visqueuse. Cela n'aurait pas manqué de perturber l'auto-organisation. Également, de la convection peut se faire dans une telle solution peu visqueuse, lorsqu'on réchauffe celle-ci depuis 4°C jusqu'à 35°C . Nous savons d'après des expériences antérieures, faites au laboratoire, que l'auto-organisation n'est pas due à des phénomènes de convection [Tabony and Job 1992-b]. Nous avons vérifié son absence dans les échantillons hors gravité; Des flux dans la solution pourraient en effet constituer un facteur important pouvant briser la symétrie de la réaction.

Nous avons donc préparé des cuves dont la moitié inférieure était remplie de colorant bleu dilué dans l'eau, et la moitié supérieure d'eau sans colorant, les deux milieux étant parfaitement miscibles. En remplissant précautionneusement la moitié supérieure, nous sommes parvenus à obtenir une interface bien délimitée.

Un des échantillons était mis en rotation dans la RPM pendant 10 minutes, tandis que l'autre, placé verticalement dans l'autre porte-échantillons, servait de témoin. Nous avons fait l'expérience à 60°/s et à 360°/s. A leur sortie, non seulement les milieux n'avaient pas bougé, mais en plus l'interface était plus nette dans les échantillons ayant tourné dans la RPM (Figure 22). Dans les échantillons en rotation, ceci s'explique par la diminution importante de la convection, phénomène n'ayant lieu qu'en présence de gravité.

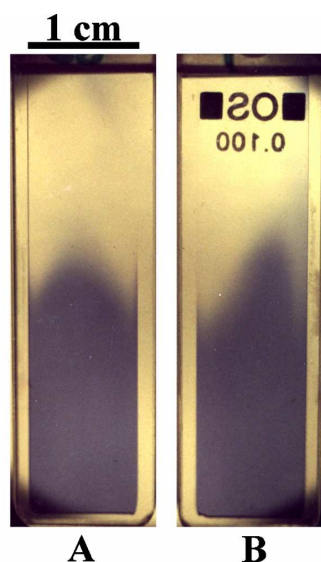


Figure 22. Absence de mélange de la solution dans des échantillons en rotation dans un clinostat. La partie inférieure de deux cuves a été remplie avec de l'eau et les cuves ont été complétées avec de l'eau et du colorant bleu de façon à identifier l'interface. Une des cuves a été mise en rotation dans le clinostat à 360°/s durant 10 minutes (A), l'autre cuve est restée verticale dans le clinostat à l'arrêt (B). La photographie (A) montre que l'interface est nette, indiquant que le liquide ne s'est pas mélangé. De plus, la convection a été réduite comme en témoigne la qualité de l'interface de l'échantillon (A) par rapport à l'échantillon (B).

1.2.2. Développement des morphologies dans la RPM

L'auto-organisation des microtubules a été suivie par biréfringence dans quatre types de cuves (cuves rectangulaires de 40 x 10 x 1 mm (400 μ l) ou 20 x 10 x 1mm (200 μ l), cuves en forme d'œufs cylindriques de 5 mm de diamètre et de 15 mm de long, et cuves fines de 40 x 10 x 0.17 mm) placées 30 minutes dans la RPM dans 4 conditions différentes : Témoins sans rotation, cuves verticales, ou bien RPM en rotation à 60°/s, 180°/s, ou 360°/s.

Deux types d'effets ont été observés dans les échantillons ayant tourné. Tout d'abord, les cinétiques de développement de ces morphologies étaient différentes par rapport à celles des témoins, ralenties dans le cas des cuves plates, au centre, et accélérées dans le cas des œufs. Par ailleurs, les morphologies finales étaient différentes des morphologies témoins. En outre, bien que parfaitement reproductibles dans les mêmes conditions, elles étaient différentes pour des vitesses de rotation différentes.

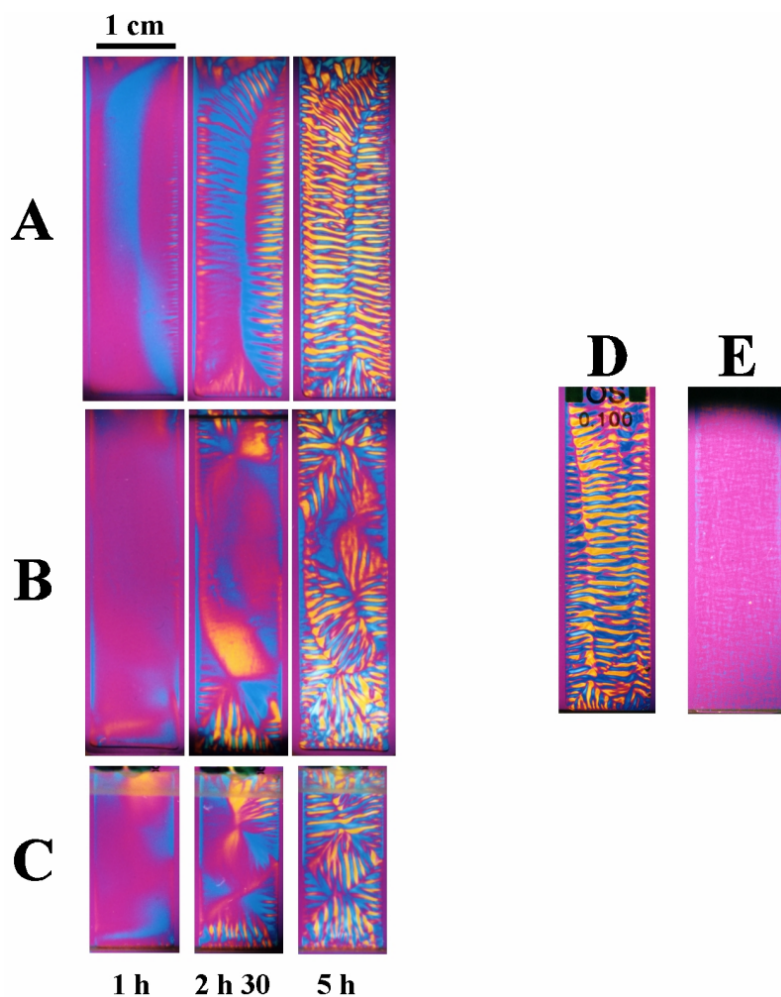


Figure 23. Développement de morphologies microtubulaires assemblées dans la 'random positioning machine' et comparaison avec les témoins à 1 g. (A) Témoin développé verticalement à 1 g. En (B) et (C), échantillons développés dans le clinostat en rotation à 60°/s durant 30 minutes. En comparaison, les photographies (D) et (E) montrent des échantillons assemblés dans le vol en apesanteur. (D) est l'échantillon témoin à 1 g et (E) s'est assemblé en microgravité.

Pour les cuves plates (200 et 400 μ l), nous avons, outre les morphologies témoins, obtenu 3 types de morphologies. Dans les 3 cas, si le haut et le bas de la cuve s'organisent à peu près aussi vite que dans les cuves témoins, le centre de l'échantillon, lui, ne s'organise que très mal et très lentement : au bout de 5 heures en effet, le centre des échantillons était encore peu biréfringent et assez hétérogène. La différence de vitesse d'organisation entre les extrémités et le centre des cuves s'explique facilement par l'augmentation de la force centrifuge dans la cuve, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de son centre. Ces morphologies ont donc commencé par se développer à partir des extrémités des cuves.

A $60^\circ/\text{s}$ sont apparues de part et d'autre de la zone centrale non organisée, deux structures striées en croix, les stries étant perpendiculaires aux parois de la cuve et à sa zone centrale. Dans le cas des cuves de 200 μl , l'espace est progressivement occupé par ces deux structures en croix, et dans le cas des cuves de 400 μl on voit apparaître beaucoup plus tardivement d'autres structures en croix moins bien organisées (Figure 23).

A $180^\circ/\text{s}$ comme à $360^\circ/\text{s}$, les morphologies finales obtenues sont plus proches des témoins, car il y a plus de stries horizontales. Cependant, elles sont aussi très irrégulières. Comme à $60^\circ/\text{s}$, le centre est plus long à s'organiser mais il fini en organisation striée avec les extrémités tachetées. La différence entre $180^\circ/\text{s}$ et $360^\circ/\text{s}$ s'observe au niveau du resserrement des stries et à l'organisation aux extrémités : à $360^\circ/\text{s}$, les stries sont très serrées et finissent par former des taches, d'autant plus vite qu'elles sont proches des extrémités.

Nous avons par ailleurs vérifié que la durée de rotation ne changeait rien à l'auto-organisation, du moment que celle-ci dépassait l'instant critique (6 minutes). De même, l'orientation d'une cuve ayant tourné dans la RPM pendant plus de 6 minutes, par rapport à la gravité (cuve placée horizontalement ou verticalement), une fois sortie de la RPM, ne modifie en rien le résultat.

En revanche, dans les cuves en forme d'œuf, dans la RPM, la cinétique de formation des morphologies est accélérée. La striation apparaît au bout d'environ 30 minutes à $360^\circ/\text{s}$, de 45 minutes à $180^\circ/\text{s}$ et de 1 heure à $60^\circ/\text{s}$, alors qu'elle ne débute qu'après 1 heure et demi dans les cuves témoin. En conséquence, les morphologies finales étaient terminées plusieurs heures avant les témoins. En ce qui concerne leur aspect, bien que l'analyse des morphologies soit plus compliquée dans ce type de cuves, on peut dire que celui-ci était assez proche des morphologies témoin avec cependant une striation beaucoup plus serrée à 180 et à $360^\circ/\text{s}$, qui a fini par former un motif taché dans les deux cas, et un aspect déformé pour la cuve à $60^\circ/\text{s}$.

Enfin, dans les cuves fines de 170 μm d'épaisseur, à $60^\circ/\text{s}$ aucune organisation striée n'était présente après 5 heures, alors qu'à $360^\circ/\text{s}$ la morphologie obtenue était tout à fait semblable avec la morphologie témoin.

Si l'on n'obtient pas le même résultat que pour des échantillons en apesanteur, c'est-à-dire que l'on ne parvient pas à empêcher complètement l'auto-organisation, l'apesanteur simulée dans la RPM a quand même ralenti très fortement l'auto-organisation dans certaines zones de l'échantillon. Deux raisons expliquent ces différences entre un vol spatial et la RPM. Tout d'abord une raison liée au principe même du clinostat : à cause de la rotation de

l'échantillon, certaines zones éloignées du centre perçoivent une force centrifuge. De plus, la RPM est un clinostat 3D, donc tournant sur les 3 axes 'x', 'y' et 'z', or la gravité s'applique dans une seule direction, 'y'. On n'a donc besoin de la moyenner que dans une seule direction, c'est-à-dire selon l'axe 'y' ; une rotation selon un axe horizontal, donc perpendiculaire à l'axe 'y' suffit pour cela. Le clinostat 3D 'perd' donc du temps à moyenner dans les autres directions de l'espace, ce qui augmente considérablement son 'g résiduel' par rapport à un simple clinostat 2D. C'est pour cette raison que nous nous sommes dirigés vers l'utilisation d'un clinostat plus simple, le clinostat 2D.

1.2.3. Random Positioning Machine en mode Clinostat 2D

La RPM, outre sa possibilité de rotation sur les 3 axes, peut également fonctionner en mode clinostat 2D, c'est-à-dire que le plateau de rotation se positionne verticalement et tourne sur lui-même, exactement comme le tube d'un clinostat. Pour une raison technique, les cuves étaient malheureusement placées perpendiculairement à l'axe de rotation (donc avec une force de centrifugation assez élevée aux extrémités).

Comme on pouvait s'y attendre, les résultats étaient assez semblables à ceux que l'on obtenait dans le mode RPM. Ils étaient même moins bons, car, à temps égaux, l'auto-organisation en mode RPM était moins avancée qu'en mode Clinostat, à 60 comme à 360 °/s. De plus, les morphologies formées, même si elles ressemblaient aux morphologies obtenues en mode RPM, étaient moins éloignées des morphologies témoins. Ceci est dû au fait que le grand axe des échantillons était en permanence perpendiculaire à l'axe de rotation dans ce mode, contrairement au mode RPM; l'échantillon subissait ainsi, en permanence, une centrifugation maximale à ses extrémités alors qu'en mode RPM cette centrifugation est davantage répartie sur l'échantillon. Dans le cas de grands échantillons, cette expérience souligne bien le gain apporté par le passage de la machine du mode clinostat en mode RPM, pour la réduction du vecteur gravité, c'est-à-dire la diminution de la force centrifuge.

1.3. Expériences dans le clinostat 2D

Le clinostat 2D est un appareil beaucoup plus simple que la RPM, bien que son principe soit le même [Cogoli et al 1980, Cogoli and Gmünder 1991]. Il s'agit d'un tube de 1 cm de diamètre environ, disposé horizontalement. Il est entraîné par un moteur électrique à une vitesse de rotation régulière, autour de son axe horizontal. L'échantillon est placé à

l'intérieur, centré dans le tube, et est en rotation sur lui-même. Comme pour la RPM, le vecteur 'g' est moyenné à 0 selon le plan vertical ce qui est, après tout, la seule direction qui nous intéresse. Les 'g résiduels' sont légèrement plus faibles que pour la RPM, mais les 'g centrifuges' sont identiques, car indépendants de l'appareil. Cependant, dans le clinostat 2D, la force centrifuge est nettement moins gênante car elle ne s'applique que dans le plan vertical (perpendiculaire à l'axe de rotation) ; or, la largeur du tube (et des échantillons) étant limitée à 1 cm, la distance par rapport au centre est de ce fait suffisamment faible pour que les 'g centrifuges' ne soient pas trop importants à la périphérie (au maximum à 4,5 mm).

Comme pour la RPM, nous avons étudié le développement des morphologies microtubulaires dans des cuves de formes différentes placées dans le clinostat 2D à l'arrêt (témoins) ou en rotation.

Nous le verrons, les effets obtenus dans ce type de machine sont beaucoup plus spectaculaires que ceux obtenus dans la RPM car ils permettent d'empêcher totalement l'auto-organisation. Cela montre, entre autres, que pour des expériences de taille réduite, le clinostat 2D remplace avantageusement une longue et coûteuse campagne spatiale. Le succès de cette expérience a conditionné la mise en place d'autres expériences sur les facteurs pouvant rompre la symétrie dans les solutions de microtubules. Ces expériences sont décrites dans le paragraphe 'C' de ce chapitre.

Cette fois-ci, trois types de cuves en verre ont été utilisés : Des cuves de type 'œufs de verre' de 5 mm \varnothing x 15 mm de long, des tubes utilisés habituellement en résonance magnétique nucléaire (tubes RMN) de 4 mm \varnothing x 100 mm de long et des cuves plates rectangulaires (400 μ l de contenance) de 40 x 10 x 1 mm.

Nous avons commencé ces expériences dans des 'œufs de verre'. Nous avons obtenu les mêmes résultats que ceux de l'expérience embarquée dans l'espace. Ensuite, nous avons réalisé ces expériences dans des tubes RMN pour réduire l'effet de rupture de symétrie observé dans les 'œufs de verre', c'est-à-dire celui qui est provoqué par la géométrie des cuves de verre. Étant parvenus à réduire considérablement le niveau de gravité et à empêcher l'auto-organisation de se faire dans les tubes RMN, nous avons réitéré dans le clinostat 2D l'expérience dans les cuves rectangulaires plates (cuves spectrophotométriques de 40 x 10 x 1 mm) faite précédemment dans la RPM. Nous obtenons là aussi une perte quasi totale de l'auto-organisation.

Dans les 'œufs de verre', nous avons fait 5 séries d'échantillons (à 60, 180, 360, 540 et 720 $^{\circ}$ /s) en plus des 2 témoins assemblés dans les mêmes conditions, clinostat à l'arrêt. Tous

les échantillons sont restés 30 minutes dans le clinostat avant d'être sortis pour être photographiés toutes les demi-heures.

Contrairement aux 'œufs de verre' organisés dans la RPM, tous les œufs ayant tourné dans le clinostat avaient une cinétique d'auto-organisation fortement ralentie par rapport aux témoins, et les morphologies qui se sont formées étaient très différentes des morphologies témoins.

A leur sortie du clinostat, contrairement aux témoins qui présentaient déjà une forte barre biréfringente sur tout l'axe de l'œuf, tous les échantillons ayant tourné ne montraient aucune biréfringence. Les microtubules étaient bien assemblés (comme on peut le vérifier par densité optique à 350 nm) et n'avaient donc pas d'orientation préférentielle. Peu à peu, une barre légèrement biréfringente s'est formée, mais plus lentement et différente de celle des témoins. Dans l'échantillon le plus lent, cette structure s'est formée avec deux heures de décalage par rapport à l'échantillon témoin. L'échantillon le plus lent a été 'le 360°/s', puis 'les 540°/s et 180°/s', et enfin 'les 60 et 720°/s', et ce, avec environ une heure et demi de décalage entre les échantillons les plus rapides et les échantillons les plus lents. La barre biréfringente qui se formait avait un aspect tout à fait particulier : elle avait un aspect plan, un peu comme un mur traversant verticalement l'échantillon du col vers le fond, et, les premiers signes de striation marquant cette barre donnaient l'impression d'une torsion de celle-ci en structure hélicoïdale. La striation finale était d'ailleurs en conséquence, puisqu'elle avait un aspect hélicoïdal avec un pas assez lâche, c'est-à-dire avec des stries larges et espacées, laissant apparaître jusqu'à la fin cet aspect de séparation par un mur le long de l'échantillon (Figure 24). La diminution de l'auto-organisation était tout à fait comparable à celle que l'on obtient en apesanteur spatiale.

Le fait qu'une nette différence de vitesse d'organisation ait été observée entre l'échantillon le plus lent (360°/s) et un des plus rapide (à 720°/s), montre bien l'importance qu'a eu la force centrifuge dans ce dernier. Dans le cas 'du 60°/s' qui s'est organisé aussi vite que 'le 720°/s', le problème ne vient plus de la force centrifuge, puisque la vitesse de rotation est très faible, mais d'un 'g résiduel' trop élevé ($3 \cdot 10^{-2}$ g). Dans 'le 360°/s', la vitesse de rotation est suffisamment élevée pour diminuer convenablement le 'g résiduel' (10^{-2} g), mais pas assez pour générer une trop grande force centrifuge parasite. Il s'agit donc bien de trouver un bon compromis entre la diminution du 'g résiduel' et l'augmentation des 'g centrifuges' pour obtenir les meilleures conditions d'impesanteur.

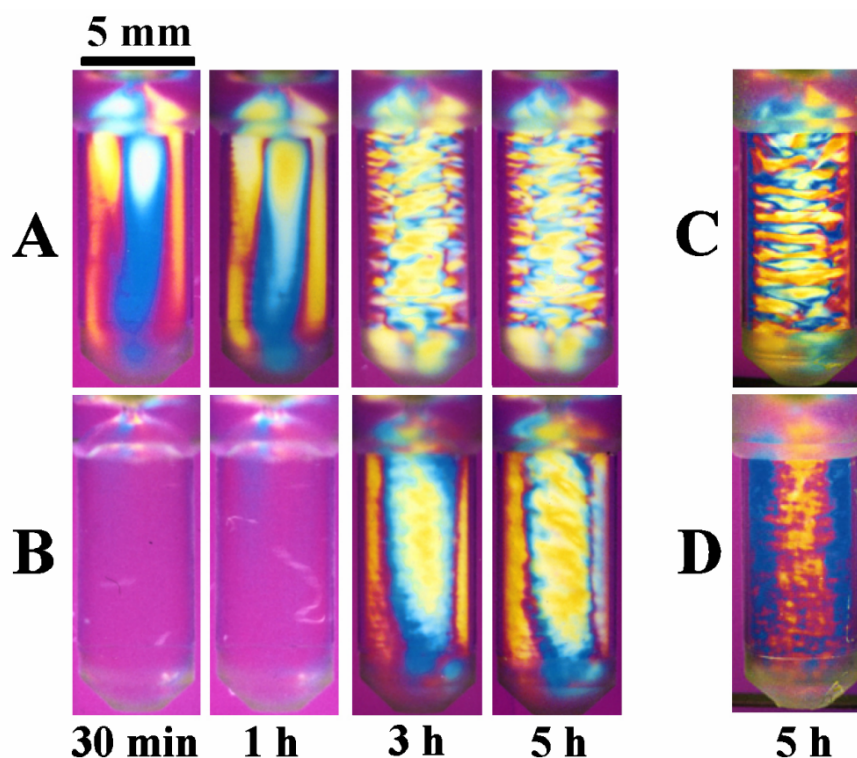


Figure 24. Comparaison du développement d'une morphologie microtubulaire auto-organisée dans un tube cylindrique en forme d'œuf, assemblée dans un clinostat 2D en rotation à $360^\circ/s$ durant 30 minutes (B); En comparaison, le témoin assemblé à 1 g (A). En référence, les photographies (C) et (D) montrent respectivement l'échantillon témoin à 1 g et l'échantillon en apesanteur obtenus lors du vol spatial après 5 heures. Le développement de (B) au cours du temps montre la formation d'une 'barre' biréfringente qui se forme à partir d'une légère asymétrie au niveau du col de la cuve.

Une autre remarque importante est que dans tous ces échantillons, l'apparition de la barre biréfringente commençait au niveau du col des échantillons et que, très longtemps après le début de l'auto-organisation, le fond de l'échantillon restait non-organisé. On peut alors supposer que c'est l'aspect du col, très étroit ($0.5 \text{ mm } \varnothing$), qui en provoquant une rupture de symétrie spatiale, déclenchait l'auto-organisation dans certains échantillons réticents à l'auto-organisation ($360^\circ/s$ et $540^\circ/s$). Notons cependant que même dans l'espace, les échantillons préparés dans des 'œufs de verre' présentaient une barre biréfringente après 5 heures de développement et avaient fini par s'auto-organiser partiellement après une très longue durée de développement (une nuit) [Glade and Tabony 2001]. Il y a fort à parier que les raisons expliquant l'auto-organisation partielle des échantillons 'œufs de verre' dans l'espace soient les mêmes que celles qui sont à l'origine de l'auto-organisation dans l'expérience précédemment décrite.

Cette observation nous a amené à penser qu'il serait intéressant de refaire cette expérience en utilisant cette fois encore des échantillons en forme d'œufs, mais de longueur beaucoup plus importante pour retarder un éventuel déclenchement de l'auto-organisation par le col. A cet effet, nous avons ensuite essayé le même type d'expérience, mais avec des tubes RMN de 4 mm et longs de plusieurs centimètres. La longueur des échantillons devait être grande pour prévenir une importante partie des échantillons d'une éventuelle rupture de symétrie provenant des extrémités du tube (ménisque et fond arrondi du tube). Les solutions ont toutes été préparées de la même façon : Les tubes RMN contenaient 1 ml de solution de tubuline à 10 mg.ml^{-1} et 2 mM de GTP; Une pellicule de 5 mm d'huile de silicone, servant de bouchon pour ces tubes, a été déposée à la surface de la solution. Un volume de 1 ml de solution correspond à une longueur de 7.5 cm dans le tube RMN. Les échantillons ont été mis en rotation à $360^\circ/\text{s}$ dans le clinostat durant 20 minutes. Cette vitesse était optimale pour les 'œufs de verre'. Des témoins qui ont été faits dans les mêmes conditions, clinostat à l'arrêt, se sont développés normalement et rapidement en jolies morphologies striées.

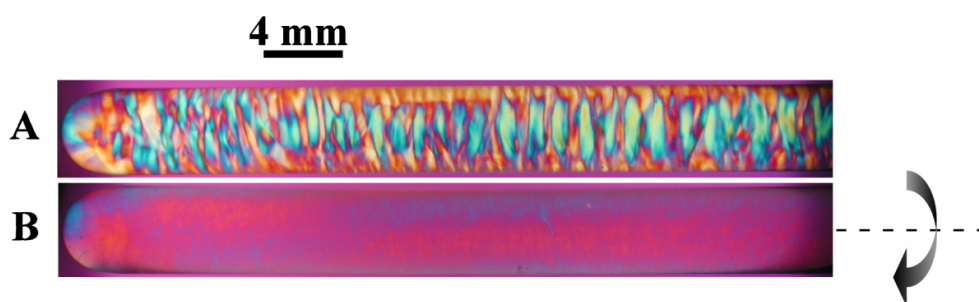


Figure 25. Développement de morphologies microtubulaires auto-organisées dans des tubes RMN de 8 cm, à 1 g (A), et dans un clinostat 2D en rotation à $360^\circ/\text{s}$ durant 20 minutes (B). Photographies faites en biréfringence après 5 heures. Cette fois-ci l'auto-organisation ne se fait pas car l'auto-organisation partielle aux extrémités ne se propage pas. L'auto-organisation est complètement empêchée dans le clinostat 2D dans ces cuves, au même titre que les échantillons préparés dans des cuves rectangulaires de spectrophotomètre en apesanteur lors du vol spatial (Fig. 23 E).

Cette fois-ci, les résultats des expériences ont dépassé nos espérances. Nous sommes parvenus à empêcher complètement l'auto-organisation des échantillons pour des durées largement supérieures à 5 h et à ne jamais dépasser le stade d'une organisation très sommaire (quelques taches très légèrement biréfringentes) après plusieurs dizaines d'heures. Seule une légère organisation apparaissait sur quelques millimètres au niveau du fond du tube et surtout au niveau du ménisque, sans se propager davantage dans le reste de l'échantillon (Figure 25).

Dans ces échantillons, l'auto-organisation était même plus diminuée que dans les 'œufs de verre' de l'expérience spatiale (cf. Figure 24).

Le ralentissement, voire le blocage de l'auto-organisation dans les cuves de type 'œufs de verre' étant bien meilleur dans le clinostat 2D que dans la RPM, nous avons à nouveau voulu voir si l'on pouvait obtenir de tels résultats dans des cuves rectangulaires de spectrophotomètre de 40 x 10 x 1 mm. Nous avons fabriqué un nouveau porte-échantillons allant dans le clinostat 2D pour ce type de cuves. Ce porte-échantillons est conçu de telle sorte que le grand axe des cuves se confond avec l'horizontale, l'échantillon étant par ailleurs parfaitement centré en largeur et en profondeur sur l'axe de rotation. Par rapport à une cuve placée dans la RPM, la force centrifuge maximale ne peut cette fois-ci s'exercer que dans la largeur de l'échantillon, c'est-à-dire à 5 mm du centre. A 360°/s ce 'g centrifuge' est de $2 \cdot 10^{-2}$ g et de $5 \cdot 10^{-3}$ g à 180°/s; ces valeurs sont proches de celle du seuil de déclenchement de l'auto-organisation qui se situe aux alentours de 10^{-2} g, mais bien inférieures aux valeurs minimales atteintes dans la RPM (respectivement $8.1 \cdot 10^{-3}$ g à 360 °/s et $2 \cdot 10^{-2}$ g à 180°/s). À cause d'une limitation du clinostat, seules des rotations à 360°/s et à 180°/s ont pu être testées. Dans ces deux cas, le développement des morphologies a été suivi au cours du temps. Les échantillons sont restés 20 minutes dans le clinostat.

Dans le clinostat 2D, le ralentissement de la formation d'un motif a été considérablement plus élevé que dans la RPM. À la sortie du clinostat, contrairement aux témoins les échantillons en rotation ne présentaient pas de barre biréfringente. A 360°/s, l'auto-organisation a fini par démarrer avec un retard d'une heure environ par rapport au témoin; la structure s'est faite ensuite lentement en une dizaine d'heures. Par contre, au bout de 5 heures les échantillons à 180°/s restaient très peu biréfringents. La partie basse des cuves (celle qui est éloignée du col) était très peu biréfringente. La partie de la cuve à proximité du col comportait rapidement quelques stries indiquant que, comme dans les 'œufs de verre', une certaine rupture de symétrie s'était produite au niveau du col. Le développement des morphologies a été très lent et a pris plus de 10 heures. Au bout d'une longue durée, le même type de formation que celles qui ont été obtenues dans la RPM, a été observé, à la fois pour l'échantillon à 360°/s, et pour celui à 180°/s. Les morphologies témoin, c'est-à-dire les cuves horizontales, clinostat à l'arrêt, ont abouti normalement à des morphologies en cercles concentriques formées en 5 heures. Dans ce cas, on passe très près de l'absence de déclenchement de l'auto-organisation, comme dans les échantillons qui se sont développés en

apesanteur lors du vol spatial. Il semble que la double contribution des effets de géométrie des cuves et de force centrifuge résiduelle suffit à la rétablir partiellement (Figure 26).

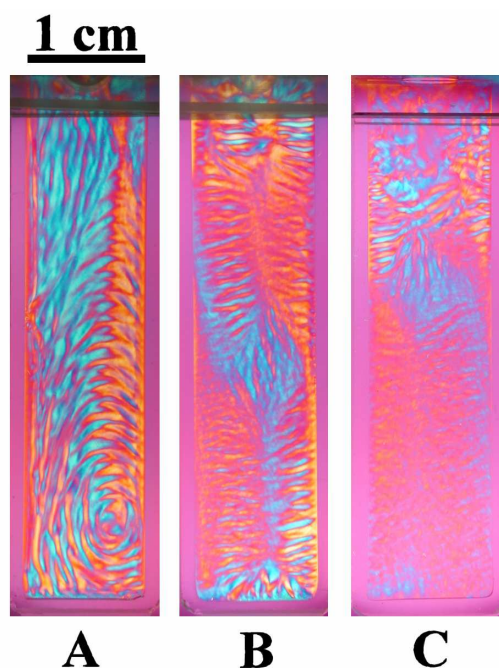


Figure 26. Développement de morphologies microtubulaires auto-organisées dans des cuves de 4 cm x 1 cm x 1mm, à 1 g (A), dans le clinostat 2D à 360°/s durant 20 minutes (B), dans le clinostat 2D à 180 °/s durant 20 minutes (C). Les échantillons ont été photographiés après 5 heures. Le ralentissement des morphologies est bien supérieur à celui obtenu dans la RPM (cf. Fig.22). L'échantillon à 180 °/s n'a ensuite que très peu évolué.

1.4. Conclusions des expériences en apesanteur simulée

En réalisant avec beaucoup de soin ces expériences de simulation d'apesanteur, nous sommes parvenus à empêcher complètement l'auto-organisation dans des cuves cylindriques de grande taille et à la ralentir de façon très importante dans des cuves rectangulaires de spectrophotométrie. Nous arrivons ainsi, à moindres frais et avec une grande facilité, aux mêmes résultats que ceux qui ont été obtenus en 1998 dans l'expérience embarquée dans la fusée sonde de l'agence spatiale européenne. Nous sommes cependant bien au sol, sur terre, et bien que fortement réduit par le clinostat, le vecteur gravité reste présent sous une forme résiduelle. A cela s'ajoutent des composantes d'accélération résiduelles inhérentes au mode de fonctionnement de ces appareils. Dans plusieurs expériences, en particulier dans la RPM, une organisation plus ou moins partielle assurément due à ces composantes résiduelles est apparue dans les échantillons. Les forces résiduelles de centrifugation, s'exerçant sur les zones distantes du centre des échantillons ainsi, que le 'g résiduel' (de l'ordre de 10^{-2} g) de l'appareil, sont tout de même 10000 fois supérieures au niveau d'impesanteur que l'on obtient en apesanteur lors d'un vol spatial. Dans toutes les cuves plates mises à tourner dans la RPM, y compris en mode clinostat, le centre restait longtemps non-organisé. Dans la RPM,

l'organisation commençait toujours à partir des extrémités des cuves, puis se propageait lentement vers le centre, et elle se faisait d'autant plus vite que la vitesse de rotation était élevée et qu'on s'éloignait du centre.

D'autres effets déclencheurs de l'auto-organisation sont apparus, notamment la géométrie des conteneurs. Dans les 'œufs de verre' dans le clinostat 2D, l'auto-organisation a fini par se faire, mais très lentement et en partant du col. Ce ralentissement était particulièrement important lorsque la force centrifuge générée par la rotation n'était pas trop élevée. En effet, en augmentant trop la vitesse de rotation des œufs, on augmente aussi l'intensité des 'g centrifuges' s'appliquant à distance du centre. Ceci montre bien l'influence de la force centrifuge dans l'auto-organisation des échantillons en pesanteur réduite. De plus, lorsque la vitesse de rotation n'était pas assez élevée, le vecteur gravité était trop faiblement moyenné, donc l'intensité du 'g résiduel' trop élevée, ce qui provoquait inmanquablement l'auto-organisation.

Cependant, ces expériences ont montré qu'on se situait avec ces appareils à la limite extrême de l'auto-organisation, certains échantillons (œufs de verre à 360°/s dans le clinostat 2D par exemple) ayant un processus d'auto-organisation très fortement ralenti voire complètement empêché (tubes RMN à 360°/s dans le clinostat 2D). On peut donc affirmer qu'une valeur de gravité inférieure à 10^{-2} g suffit à empêcher le processus d'auto-organisation, et inversement que des valeurs légèrement supérieures suffisent à le déclencher et à former de belles structures, bien que différentes de celles que l'on obtient normalement à 1 g.

Les organismes vivants soumis aux stress de l'apesanteur présentent des signes semblables : leur cytosquelette est désorganisé et un grand nombre de fonctions cellulaires liées à celui-ci sont atteintes. Les travaux que nous avons faits sur les microtubules *in vitro* et dans des conditions de pesanteur réduite s'accordent pleinement avec ces observations faites sur du vivant. Notre système d'auto-organisation des microtubules *in vitro* constitue donc probablement un bon modèle pour expliquer la gravisensibilité des êtres vivants, tant au niveau de leur organisation et de leur développement, que d'une grande partie de leur fonctionnement interne.

2. Lévitiation magnétique en champs magnétiques intenses

Un autre moyen pour agir sur les microtubules et sur leur auto-organisation passe par l'utilisation de champs et de gradients de champs magnétiques intenses. Ceci permet d'obtenir

potentiellement deux effets : un effet directement dû au champ magnétique qui génère un couple s'exerçant sur les objets magnétiquement anisotropes [Vassilev et al 1982, Bras et al 1998] et un effet lié à la force générée dans un champ non-homogène. Pour la lévitation magnétique, c'est ce deuxième effet uniquement qui nous intéresse. La variation d'un champ magnétique génère une force qui s'applique à un niveau atomique. Avec les petits aimants que nous utilisons couramment, cette force nous est imperceptible. Dans un aimant de très forte intensité, on peut cependant parvenir à générer une variation du champ telle que n'importe quelle matière subit une force d'intensité qui suffit à attirer ou repousser des objets d'une quelconque matière. Si cette force est dirigée vers le haut et de valeur absolue égale à celle de la gravité terrestre, alors son interaction avec un objet provoque sa lévitation. Cet objet peut être constitué de matière inerte (goutte d'eau, bout de plastique) ou de matière vivante (cellules, animal vivant, molécules biologiques) [Beaugnon and Tournier 1991, Geim 1998].

Dans le cadre d'une collaboration avec Éric Beaugnon au CRETA-CNRS puis avec le LCMI-CNRS, nous avons donc effectué des expériences montrant l'influence des champs magnétiques intenses et de la lévitation magnétique sur l'auto-organisation des microtubules. Les expériences de lévitation magnétique (gradient de champ) ont été réalisées dans un aimant supraconducteur du CRETA, pouvant atteindre 17 Teslas et capable de générer de forts gradients de champ (cf. Annexe 5.1). Les expériences pour l'étude de l'effet du champ magnétique lui-même ont été réalisées au CRETA pour la partie 'aimant vertical' et au LCMI pour la partie 'aimant horizontal'.

Dans cette section, nous décrivons des expériences visant à simuler des conditions d'apesanteur au sol grâce à la lévitation magnétique générée par les gradients de champ intense, afin d'empêcher l'auto-organisation des microtubules. Dès les premières expériences, comme nous le verrons, il a été difficile de séparer les phénomènes dus à la lévitation magnétique et ceux dus au champ magnétique. En effet, en lévitation magnétique, le champ magnétique intense est toujours présent et a, lui-même, une action qui lui est propre, sur les microtubules (cf. Section B.1 de ce chapitre). On peut toutefois faire certaines observations distinctes sur ces deux types d'effets. Nous montrons que la lévitation magnétique, malgré la présence du champ, permet de ralentir fortement l'auto-organisation.

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer la valeur de champ permettant la lévitation des solutions de microtubules (cf. Annexe 5.2) et pour mettre au point le matériel indispensable pour ces expériences (cf. Annexe 5.3). La valeur de champ nécessaire pour obtenir la lévitation est de 15.62 Teslas. Dans l'aimant vertical, en une

position située à 6.5 cm au-dessus du centre magnétique de l'aimant, le gradient de champ est maximal et dirigé vers le haut. En ce point nommé 'position 0 gH', le gradient de champ s'oppose à la gravité et provoque la lévitation : la gravité est dirigée vers le bas et l'intensité de son accélération est de 1 g, et le gradient de champ magnétique est dirigé vers le haut et l'accélération qu'il produit est aussi égale à 1 g. La position opposée, c'est-à-dire à 6.5 cm en dessous du centre magnétique de l'aimant, est la position dite '2 gH'. En ce point, le gradient de champ magnétique est maximal et dirigé vers le bas et la force qu'il produit s'ajoute ainsi à celle que produit la gravité sur la matière présente en ce point ; l'accélération résultante est donc dirigée vers le bas et équivaut à une accélération de la gravité de 2 g. Au centre de l'aimant, en position dite '1 gH', il n'y a aucun gradient de champ magnétique, mais le champ magnétique y est maximal et est relativement homogène; c'est la position de champ maximal nommé 'Hmax' (cf. Annexe 5.2).

Le but premier de nos expériences en champs magnétiques intenses était de faire léviter les solutions de microtubules pour simuler des conditions d'apesanteur comme lors d'un vol spatial. Nous avons mis à assembler dans l'aimant des échantillons qui étaient retirés après 15 minutes d'exposition à l'aimant pour être observés. Nous avons utilisé deux types de conteneurs: des cuves de verre de 40 x 10 x 1 mm et des cuves de verre de 20 x 10 x 1 mm plus petites mais permettant de se restreindre à des zones de champ assez homogènes. Les échantillons étaient ensuite placés au chaud et leur développement a été photographié (cf. Annexe 2). Des durées d'exposition au champ différentes ont été testées.

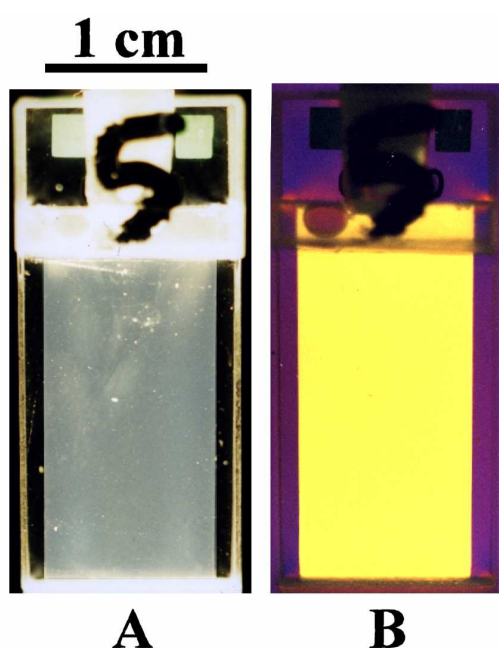


Figure 27. Orientation uniforme des microtubules dans des échantillons exposés à des champs magnétiques intenses. Les deux photographies correspondent au même échantillon resté 15 minutes dans un champ magnétique de 15.62 T: (A) orienté à 5° par rapport au polariseur (en polarisation croisée), (B) orienté à 45° par rapport au polariseur (avec λ), après 30 minutes. La forte biréfringence indique l'orientation uniforme des microtubules selon l'axe vertical, c'est-à-dire selon l'axe du champ magnétique.

Nous montrons avec ces expériences que l'on peut ralentir fortement l'auto-organisation des microtubules en faisant léviter des préparations dans des cuves de spectrophotomètre. Les expériences de lévitation en champ magnétique n'ont pourtant pas été simples à élaborer car, contrairement à la simulation d'apesanteur dans les clinostats, il fallait tenir compte du fait que cette fois-ci, il y avait plusieurs forces en jeu : la gravité, le gradient de champ magnétique s'y opposant, et une force de couple magnétique s'appliquant sur les objets magnétiquement anisotropes comme justement les microtubules [Vassilev et al 1982, Bras et al 1998] (cf. Annexe 5). Nous le verrons, cela rend l'interprétation des résultats plus difficile. De très nombreuses séries d'expériences ont été faites et ont permis de trouver des conditions dans lesquelles l'effet de ralentissement de l'auto-organisation par la lévitation magnétique a été mis en évidence.

Au début des expériences de lévitation magnétique, malgré un niveau d'apesanteur très faible en position '0 gH', nous nous sommes aperçus dès les premiers échantillons que nous n'obtenions pas le résultat escompté. Les échantillons s'auto-organisaient quand même. Les morphologies qui se sont développées, bien que particulièrement régulières étaient différentes des morphologies témoin, verticales à 1 g : à la sortie de l'aimant après 15 minutes les échantillons étaient extrêmement biréfringents quand on les tournait par rapport à l'axe des polariseurs de quelques degrés seulement (Figure 27).

Très rapidement, les échantillons se sont développés en structures composées de stries très rectilignes et régulièrement disposées depuis le haut de la cuve jusque tout en bas (Figure 30), contrairement aux cuves témoin, dont les stries sont moins droites et moins régulières et qui présentent des stries perpendiculaires au fond de la cuve, disposées dans une formation triangulaire (Figure 10). Cette biréfringence uniforme et intense provient d'une orientation massive des microtubules dans l'axe des lignes de champ magnétique, sous l'action du champ magnétique lui-même et non à cause du gradient de champ. Ce phénomène, nous le verrons, se produit lorsque les microtubules sont encore suffisamment courts, donc au cours de la phase de croissance et de nucléation des microtubules. Cette phase dure environ 2 minutes. À cause de leur forme fibrillaire, les microtubules sont des objets particulièrement anisotropes vis-à-vis des champs magnétiques intenses. De tels objets se réorientent dans un champ magnétique à la manière d'une boussole dans le champ magnétique terrestre, à cause du couple magnétique qui s'exerce sur eux. Cependant, ces fibres pour se réorienter se doivent d'être suffisamment courtes. Si elles sont prises, entremêlées dans un réseau très dense comme c'est le cas pour les microtubules lorsque leur élongation devient importante, alors leur

réorientation dans le champ est impossible et le système devient 'insensible' à l'action du champ magnétique intense. Le moment à partir duquel le système est sensible à l'action de la gravité et bifurque, se situe aux alentours de la 6^{ème} minute. Pour savoir s'il s'agit bien de l'effet du champ magnétique sur les microtubules de petite taille, il suffit de faire pré-assembler quelques minutes les microtubules de l'échantillon en dehors de l'aimant avant de plonger l'échantillon dans le champ. En procédant ainsi, on s'aperçoit effectivement que le système est sensible à l'action du champ magnétique à partir de la 3^{ème} minute, jusqu'à la 5^{ème} minute de la réaction, c'est-à-dire pendant que les microtubules sont encore en cours de nucléation et d'élongation. Cette partie concernant l'effet du champ magnétique sera détaillée ultérieurement.

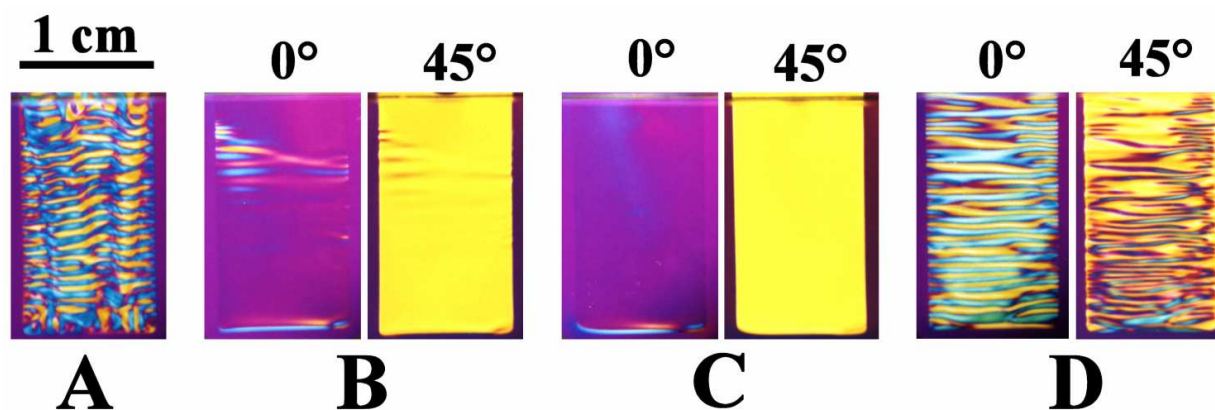


Figure 28. Échantillons placés dans l'aimant à 15.62 T durant 10 heures. Toutes les photographies ont été prises en polarisation linéaire croisée avec une lame compensatrice λ . (A) en position 0 gH (à 0° et à 45° par rapport au polariseur), (B) en position 1 gH (à 0° et à 45° par rapport au polariseur), (C) en position 2 gH (à 0° et à 45° par rapport au polariseur). À la sortie de l'aimant, (A) est fortement ralenti et (B) n'est pas organisé. Ces échantillons ne montrent pas ou peu de stries mais leurs microtubules sont uniformément orientés selon l'axe vertical comme le montrent les photographies prises en biréfringence à 45° par rapport au polariseur (cf. Figure 27). L'échantillon (C), quant à lui, est très strié.

Revenons à la lévitation magnétique proprement dite. Une première constatation quand on met des échantillons dans l'aimant aux positions '0g H' et '2 gH', les deux positions où on applique un gradient, est que ces échantillons se développent à des vitesses différentes et présentent des différences de morphologies. Les échantillons à '0 gH' se développent lentement et peuvent même parfois rester non organisés, malgré la forte orientation des

microtubules. Les échantillons à '2 gH' se développent très rapidement, plus rapidement que des morphologies témoins, et montrent une forte striation très serrée. Pourtant ces deux échantillons, celui en lévitation et son opposé en 'gravité augmentée' sont exactement dans les mêmes conditions de gravité (1 g), de champ magnétique (11.9 T à ces positions '0 gH' et '2 gH' quand le champ maximal est de 15.62 T) et de gradient de champ, à l'orientation du gradient de champ près. Cela signifie que malgré l'effet 'gênant' du champ magnétique, la lévitation magnétique peut provoquer un fort ralentissement de l'auto-organisation (Figure 28).

Lorsque l'on fait assembler hors champ, durant environ 4 à 5 minutes, l'échantillon devient beaucoup moins sensible au champ magnétique lui-même; les microtubules sont en effet trop allongés et leur réseau est trop dense pour que le couple magnétique puisse les réorienter. La préparation n'est alors quasiment plus soumise qu'à l'action du gradient de champ magnétique et à la gravité. On observe alors une nette différence entre les échantillons à '0 gH' et ceux à '2 gH'. L'échantillon à '2 gH' ressemble à une morphologie témoin, malgré un grand nombre de stries plus serrées et un développement plus rapide. Cela s'explique par l'intensité plus élevée de la pesanteur effective, à cette position. Au bout de 5 heures par contre, l'échantillon en lévitation magnétique reste très faiblement organisé. Il présente des grandes zones biréfringentes mais non striées. Cette fois, c'est bien l'effet de la lévitation magnétique que l'on observe (Figure 29). Cette expérience prouve l'efficacité de la lévitation magnétique pour simuler des conditions d'apesanteur sur terre.

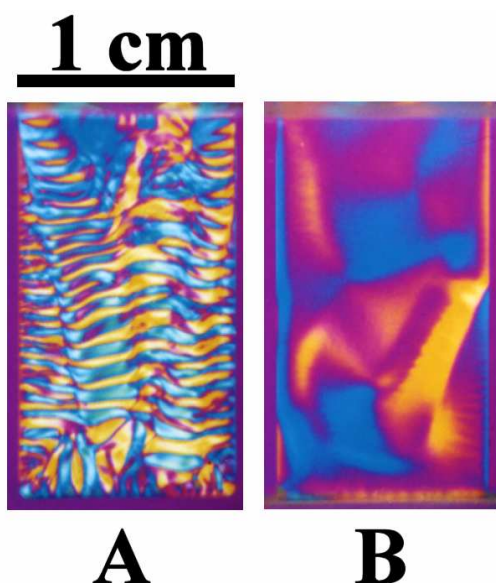


Figure 29. *Effet de la lévitation magnétique. L'échantillon (B) a été mis à assembler à 35°C hors de l'aimant durant 5 minutes puis il a été placé dans l'aimant à 15.62 T durant 15 minutes en position 0 gH. Par rapport au témoin développé à 1 g hors champ (A), l'auto-organisation de l'échantillon (B) est fortement ralentie par la lévitation magnétique. Photographies prises en biréfringence après 5 heures de développement.*

B. Modification de l'auto-organisation des microtubules par l'ajout d'autres champs externes

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la façon dont on peut empêcher l'auto-organisation de se produire. Il est intéressant également de connaître le comportement des solutions de microtubules sous gravité normale, lorsqu'on applique sur celles-ci un champ externe différent ou d'intensité différente. L'observation de leur comportement donne des indications sur la façon dont les champs agissent sur la population de microtubules en solution.

1. Effet des champs magnétiques intenses

Nous l'avons mentionné précédemment, dans un champ magnétique uniforme, parmi les substances non ferromagnétiques, seuls les objets présentant une asymétrie de forme sont susceptibles d'avoir un comportement particulier. L'exposition des microtubules à un champ magnétique suffisamment intense peut provoquer leur réorientation à cause du couple magnétique s'exerçant sur leur forme anisotrope. En appliquant un champ magnétique uniforme, c'est-à-dire sans gradients de champ, cet effet est maintenu. Nous avons pu montrer que l'effet des champs magnétiques uniformes permet d'obtenir un type particulier de morphologie. Nous montrons que, sous champ magnétique, les microtubules s'auto-organisent ainsi parce qu'au départ de la réaction, durant les premières étapes de l'assemblage, les microtubules sont orientés selon une direction préférentielle. Nous verrons plus tard dans la partie concernant la modélisation, que cette observation est particulièrement importante. Une des conjectures du modèle est que les champs externes induisent un biais directionnel dans l'orientation des microtubules. Lorsque quelques microtubules sont orientés, les autres microtubules suivent leurs traces et sont orientés à leur tour. À partir de ce moment, la symétrie de la réaction est rompue et l'auto-organisation débute (cf. Partie modélisation). Expérimentalement le champ magnétique ne peut effectivement agir sur ces solutions que par l'orientation forcée et préférentielle des microtubules. C'est un mécanisme qui touche directement les bases moléculaires du processus et qui, pour nous, est plus simple à comprendre que l'action de la gravité.

En outre, nous avons pu montrer que l'on pouvait, comme prévu, faire bifurquer le système vers d'autres types de morphologies avec ces champs magnétiques intenses. Nous

avons mesuré les valeurs minimales de champ nécessaires pour faire bifurquer le système d'une morphologie témoin obtenue à 1 g, à une morphologie de 'type aimant'. Ces expériences ont été faites sur des cuves disposées horizontalement et sur des cuves disposées verticalement. Les valeurs de champ nécessaires pour obtenir une bifurcation ne sont pas les mêmes dans les deux cas.

1.1. Expériences en champ magnétique vertical.

Lorsque l'on met à assembler durant une dizaine de minutes, une solution de tubuline dans un champ magnétique uniforme intense, les microtubules qui se forment s'orientent dans l'axe du champ. A la sortie de l'aimant, une très forte biréfringence est effectivement visible quand on décale l'axe de la cuve de seulement quelques degrés par rapport à l'axe des polariseurs (Figure 27). Quelle que soit la position dans le champ, si son intensité est suffisante, une morphologie typique de l'exposition aux champs intenses se développe. En revanche, selon la position de l'échantillon par rapport au centre magnétique de la bobine et l'intensité du champ, cette morphologie se développe plus ou moins vite.

La morphologie typique de type aimant est constituée de stries très droites et aux contours particulièrement nets. Ces stries sont disposées depuis le haut jusque tout en bas de l'échantillon. Dans une morphologie témoin à 1 g, les stries sont beaucoup moins longilignes et ne vont pas jusqu'en bas de la cuve ; au fond de ces cuves, on observe une ou deux structures triangulaires, formées de stries verticales perpendiculaires à la base (Figure 30).

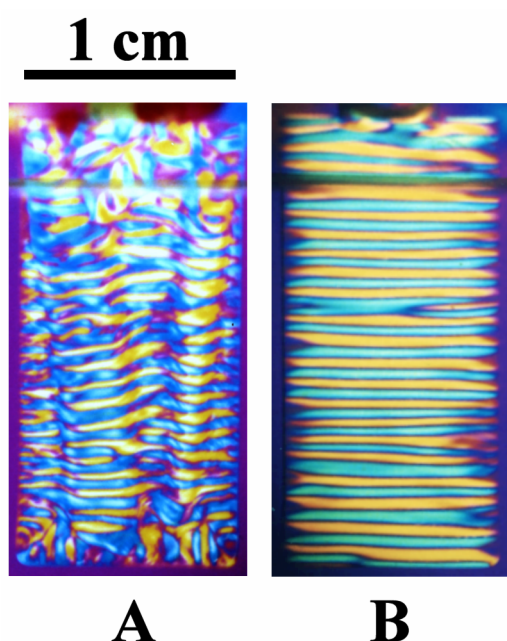


Figure 30. Morphologie caractéristique de type 'aimant' obtenue par auto-organisation dans un aimant à 15.62 T en position 1 gH (champ maximal et homogène), durant 10 minutes. Après 2 heures, une morphologie aux stries très régulières apparaît (B). En comparaison, une morphologie témoin obtenue hors champ en 5 heures (A). Dans la morphologie de type 'aimant', les stries sont parfaitement horizontales depuis le haut jusque tout en bas dans l'échantillon. Ce n'est pas le cas dans les morphologies témoins à 1g dans lesquelles les stries sont plus contournées, et qui comportent des stries disposées verticalement au fond de la cuve.

Nous avons déterminé que l'effet du champ ne s'applique que lorsque les microtubules sont en pleine phase de nucléation et d'élongation, c'est-à-dire durant 2 minutes environ, entre la 3^{ème} et la 5^{ème} minute de la réaction. Pour cela, nous avons préparé une série d'échantillons que nous avons mis à assembler en position '1 gH' à 15.6 T, 1 minute pour la première série, 2 minutes pour la deuxième, et ainsi de suite jusqu'à 6 minutes. Les échantillons qui se sont assemblés moins de 3 minutes dans l'aimant ont aboutit à des morphologies témoin. Au-delà, les morphologies obtenues étaient de 'type aimant'. Inversement nous avons préparé des séries d'échantillons que nous avons mis à assembler hors champ d'abord durant 'n' minutes puis que nous avons plongé dans le champ en position '1 gH' à 15.6 T jusqu'à la quinzième minute de la réaction. Cette fois ci, l'effet du champ s'observait dans les échantillons assemblés en dehors du champ durant moins de 5 minutes. Au-delà l'assemblage de la solution est trop avancé et une morphologie témoin à 1 g se développe. Pour des valeurs de champ plus faibles, la fenêtre optimale d'action du champ se resserre autour de 4 minutes.

En baissant progressivement les valeurs de champ, on peut déterminer quelle est la valeur minimale du champ nécessaire pour l'obtention de morphologies de type aimant. Cette valeur est de 7 Teslas. En deçà, même si l'échantillon sortant de l'aimant présente une forte biréfringence due à l'orientation des microtubules sous l'action du champ, c'est une morphologie témoin qui apparaît.

En ce qui concerne la cinétique de développement des structures, si à la sortie de l'aimant les échantillons sont complètement orientés aux trois positions dans le champ, on s'aperçoit rapidement que les morphologies ne se développent pas à la même vitesse. Nous avons déjà vu que la position la plus rapide est la position '2 gH' et la plus lente, la '0 gH', et que l'on pouvait imputer cette différence à l'orientation vers le bas, dans le premier cas et vers le haut, dans le deuxième, de la force générée par le gradient de champ. Cependant, il n'en reste pas moins que l'échantillon à '1 gH' se développe également très lentement à un champ de 15.6 Teslas alors qu'aucune force ne s'oppose cette fois à la gravité. Pour de longues expositions au champ (plus de 5 heures) ou pour des expositions à des champs plus intenses (16.5 Teslas), cette position peut même s'avérer être la plus lente des trois. L'effet du champ dans ce cas peut aller jusqu'à empêcher l'apparition de morphologies de type aimant en laissant les microtubules 'bloqués' selon la seule orientation qu'ils avaient en sortant de l'aimant. Aucune strie ne se développe dans ces échantillons, même plusieurs heures après être sortis du champ (Figure 28 B).

Inversement, dans d'autres conditions de champ (ou de gradient de champ), la vitesse de formation des morphologies de type aimant peut être fortement augmentée. Ainsi, des morphologies de type aimant, très correctement formées ont pu être terminées après moins de deux heures de développement. Ceci est le cas lorsque l'on réduit l'intensité du champ pour des valeurs de l'ordre de 9 à 13 Teslas. Dans ce cas, si l'on sort les échantillons du champ au bout de 15 minutes, les microtubules sont bien orientés dans l'axe du champ (forte biréfringence à 45° par rapport à l'axe des polariseurs). Des stries apparaissent au bout d'une heure et l'auto-organisation de 'type aimant' peut être complète au bout d'une heure. Les réactions dans la solution n'ayant pas été accélérées, cela signifie que c'est la pré-orientation des microtubules qui favorise et accélère l'auto-organisation.

1.2. Expériences en champ magnétique horizontal.

Nous venons de le voir, un échantillon subissant un champ magnétique intense, s'auto-organise selon une morphologie striée de type 'aimant' différent d'une morphologie 'verticale' témoin à cause du couple magnétique produit par le champ magnétique uniforme sur les microtubules. Nous nous sommes demandés si l'on pouvait faire bifurquer la solution d'une morphologie normale de type 'horizontal à 1g' à une morphologie de type 'aimant', et à quelle valeur cela était possible.

Le laboratoire des champs magnétiques intenses (LCMI) dispose d'un aimant horizontal (l'aimant M2) pouvant générer un champ magnétique assez homogène montant jusqu'à 13 Teslas. Nous avons donc adapté notre matériel chauffant pour cet aimant et mis à assembler des solutions de microtubules dans cet aimant, à différentes valeurs de champ, durant 10 minutes.

Les solutions de microtubules ont été disposées horizontalement, à l'endroit de l'aimant où le champ est maximal et uniforme. Champ coupé, les morphologies qui se développent sont de type 'horizontal'. Lorsqu'on allume le champ à 13 Teslas, on obtient une morphologie de type 'aimant', même si la cuve est disposée horizontalement. En baissant progressivement l'intensité du champ magnétique, nous avons pu déterminer que la bifurcation du système se produisait pour une intensité du champ de 4 Teslas. En dessus de 4 Teslas, la morphologie obtenue est de type 'aimant' avec des stries droites ; en dessous elle est de type 'horizontale' avec des stries en cercles concentriques (Figure 31).

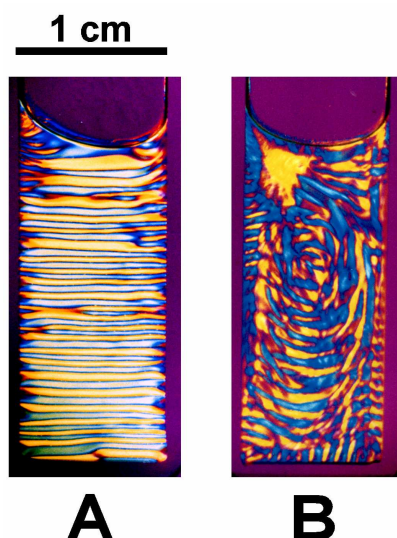


Figure 31. Bifurcation dans un aimant horizontal. Lorsque la morphologie est mise à développer 10 minutes à une valeur de champ supérieure à 4 T (ici 5 T), la morphologie obtenue (A) est de type 'aimant' avec des stries bien droites (cf. Figure 30). Si par contre, le champ est égal ou inférieur à 4 T, c'est une morphologie horizontale, avec des stries en cercles concentriques, qui se développe (B). Selon l'intensité du champ magnétique, on peut faire bifurquer la solution vers l'une ou l'autre des deux morphologies ci-contre. Les Photographies ont été prises en biréfringence après 5 heures de développement.

À l'instar des expériences de bifurcation faites en centrifugation, l'application d'un champ externe autre que la gravité, à savoir un champ magnétique, avant l'instant de bifurcation et perpendiculairement à la direction de la gravité, peut également faire bifurquer le système vers une autre morphologie. Plus précisément dans le cas de l'aimant, son effet doit être appliqué sur la solution entre la 3^{ème} et la 5^{ème} minute, la solution y étant insensible avant et après comme nous l'avons vu précédemment.

2. Effet des champs électromagnétiques

De nos jours, l'exposition aux radiations électromagnétiques atteint des sommets jusqu'ici inégalés. L'avènement de la téléphonie mobile en est la cause directe. Chacun de ces appareils est une source importante d'ondes électromagnétiques dans le domaine des micro-ondes et des ondes radar. De très nombreuses études sont en cours actuellement pour déterminer l'effet de ces radiations sur la matière vivante, en particulier sur l'induction de tumeurs et sur le développement des embryons. Malheureusement, il est difficile de se prononcer quant aux résultats de ces études tant elles sont contradictoires. En fait, l'interaction des champs électromagnétiques avec la matière vivante est encore très peu connue.

Étant constitués d'un champ électrique oscillant à forte fréquence avec un champ magnétique, on est en mesure de penser que ces champs seraient susceptibles d'interagir avec des objets magnétiquement et électriquement anisotrope. Nous avons donc mené une étude en collaboration avec Anne Perrin au CRSSA de Grenoble. Elle consistait à faire assembler et auto-organiser des solutions de microtubules dans une antenne émettant des ondes électromagnétiques de l'ordre de fréquence et de puissance d'un téléphone portable, à savoir

une fréquence de 900 MHz en modulation carrée pour une puissance de 1 mW.cm^{-2} . L'exposition se faisait durant les 30 premières minutes de la réaction.

Disons le tout de suite, cette expérience n'a pas été couronnée de succès. Il est difficile de dire si les quelques irrégularités observées sur les échantillons exposés tenaient à un léger effet des radiations ou tout simplement à la variabilité normale qu'il existe dans les solutions microtubulaires auto-organisées. De plus, à moins de réelles différences de comportement des échantillons, il aurait été difficile de conclure sur des observations faites dans un tel champ; en effet, l'émission d'un champ homogène par ces antennes est une vraie gageure. D'un millimètre à l'autre dans la zone exposée, le champ peut chuter ou augmenter brutalement de plus de 90 %. Dans ces conditions, la reproductibilité des résultats est plus que compromise. Enfin, une particularité de ces radiations à cette fréquence est qu'elles ne pénètrent que très mal la matière. Les parois de l'incubateur dans lequel étaient placées les cuves et la paroi des cuves elles-mêmes absorbent une grande partie du rayonnement et le réfléchissent, augmentant par la même occasion l'inhomogénéité du champ. C'est visiblement cette grande inhomogénéité du champ, et la grande variabilité de pénétration des radiations en fonctions des tissus qui expliquent la diversité des résultats obtenus sur l'effet des rayonnements micro-ondes sur la matière vivante. C'est pour ces raisons que nous n'avons pas poursuivi ces expériences.

C. Rétablissement de l'auto-organisation par un autre effet externe en l'absence de gravité

On a vu jusqu'ici que l'on pouvait, par des moyens assez aisés, réduire suffisamment l'effet de la gravité sur les échantillons jusqu'à empêcher la formation de morphologies auto-organisées ou bien provoquer des changements de morphologies dans les échantillons en appliquant des champs externes. Il était donc intéressant de vérifier que l'on pouvait, dès lors, rétablir complètement ou partiellement la gravité en appliquant sur un échantillon placé en apesanteur simulée soit un champ externe, soit un stress mécanique sur la solution assemblée. Par ailleurs, on montre aussi que les dimensions et la forme des échantillons suffisent à induire la formation de morphologies auto-organisées.

En reprenant le parallèle fait avec le vivant concernant l'organisation du cytosquelette, si une telle compensation de l'effet néfaste dû à l'absence de gravité est possible dans une cuve en verre, alors peut-être est-elle aussi envisageable dans des organismes vivants. Une telle

étude réalisée *in vitro* et avec des moyens simples pourrait bien fournir des perspectives thérapeutiques afin de corriger les effets néfastes dus à l'apesanteur sur les organismes et permettre le rétablissement de fonctions biologiques telles que le métabolisme des os ou la fonction immunitaire.

1. Effet des dimensions et de la forme des échantillons

Même s'il ne s'agit pas à proprement parler d'un effet externe, les dimensions et la forme du conteneur des solutions de microtubules peuvent constituer un facteur déclenchant l'auto-organisation. Il est connu que dans les systèmes de réaction-diffusion physico-chimiques, le facteur de forme peut influencer la formation des motifs qui se développent.

Dans les solutions microtubulaires, c'est également le cas. La forme de l'échantillon peut suffire à rompre la symétrie du système. Lors de l'expérience en apesanteur embarquée dans une fusée sonde [Papaseit et al 2000, Tabony et al 2001-a] (cf. Partie introductive, 2^{ème} Chapitre, Section 2.2.2), il y avait des cuves de plusieurs formes, notamment les habituelles cuves rectangulaires de 400 μ l (40 x 10 x 1 mm) et les cuves de forme cylindrique, les 'œufs de verre' de 1.5 cm de haut et de 5 mm de diamètre interne. Au retour sur terre, les solutions qui se sont développées dans les cuves rectangulaires n'ont aboutit à aucune auto-organisation, alors que dans les 'œufs de verre', l'auto-organisation à fini par se faire partiellement après un long développement. Les conditions réactives et les conditions d'apesanteur étant les mêmes, cette différence ne pouvait provenir que de la différence de forme et de dimensions entre les deux types de cuves [Glade and Tabony 2001].

Lors des expériences dans le clinostat effectuées à Zurich (décrites précédemment), nous avons eu le même phénomène : Les solutions dans les 'œufs de verre', bien que restant longtemps non-organisées, ont fini par développer partiellement. Dans cette expérience contrairement à l'expérience dans le vol spatial, nous avons pu suivre le comportement d'un échantillon dès sa sortie du clinostat et comprendre d'où provenait l'auto-organisation. Après 30 minutes de réaction, l'échantillon est uniformément mauve en biréfringence, indiquant l'absence d'organisation, sauf au niveau du col de la cuve. Le col est en effet une forme particulièrement asymétrique : il s'agit d'un rétrécissement du tube formant un court canal d'un diamètre de 0.5 mm. Au cours du temps, la biréfringence gagne toute la longueur de la cuve, menant ainsi à une organisation partielle de la solution. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons réitéré cette expérience en utilisant des tubes plus longs, les tubes RMN, afin de préserver le gros de l'échantillon de l'organisation partielle induite par le col.

Le même effet est observé lorsqu'il y a un ménisque liquidien à la solution. La zone de jonction du ménisque avec la cuve (lorsqu'on ne remplit pas complètement la cuve) est un endroit particulièrement propice à favoriser l'orientation préférentielle de quelques microtubules. Le ménisque de la solution est extrêmement fin et pourrait dicter leur orientation aux microtubules. Ces zones sont en général des départs d'organisation. Dans des capillaires de verre très fins (environ 50 μm de diamètre) les microtubules s'auto-organisent aussi mais leur orientation privilégiée est donnée par le grand axe du capillaire. En simulation, nous montrons que la géométrie du conteneur permet de rompre la symétrie et de provoquer l'auto-organisation. Cependant, nous montrons qu'il n'y a nul besoin de faire intervenir des interactions et contraintes mécaniques entre les microtubules et les parois du conteneur. La rupture de symétrie due aux parois agit en passant par une modification de la réactivité des microtubules: les microtubules 'sentent' la présence des parois par des processus faisant intervenir la réactivité des microtubules et la diffusion moléculaire de la tubuline (cf. Partie modélisation, 2^{ème} Chapitre, Section 3.4.1).

La forme des cellules et des tissus joue un grand rôle dans le développement et l'organisation des êtres vivants. Les microtubules pourraient en être le vecteur principal. En apesanteur, les œufs d'oursin, de forme sphérique, restent bloqués un long moment dans leur développement au niveau de la gastrulation avant de poursuivre leur développement normal. Ce n'est pas le cas pour les œufs de drosophile de forme ovoïde. Dans les 'œufs de verre' en apesanteur, les microtubules ne s'auto-organisent pas durant un long moment. L'auto-organisation finit par se déclencher à partir d'une rupture de symétrie liée à la forme de l'échantillon et gagne, au moins partiellement, tout l'échantillon.

2. Effet de cisaillement dans la solution (bulles d'air, pointe de seringue, billes magnétiques)

Parmi les effets pouvant déclencher l'auto-organisation il y a entre autres le fait d'orienter quelques microtubules dans une direction préférentielle dans la solution. C'est d'ailleurs ce que l'on fait en plaçant des échantillons sous champ magnétique intense. Dans ce cas on applique l'effet de 'pré-orientation' des microtubules de façon globale et on ne touche que les microtubules en cours de nucléation.

Une autre manière pour orienter quelques microtubules dans la solution est d'appliquer un cisaillement dans la solution. Cette fois, l'effet immédiat est local et ne s'applique qu'aux endroits où la solution a été cisillée. Lors de l'expérience faite en apesanteur durant le vol

spatial, en raison d'une difficulté technique pour dégazer correctement les solutions, des bulles d'air formées dans le col des cuves ont traversé durant la période mouvementée de réentrée du module dans l'atmosphère, les échantillons placés en apesanteur. Normalement, ces échantillons n'auraient pas dû s'auto-organiser. Cependant, il a été frappant de voir que sur la trajectoire de ces bulles d'air inopportunes, une biréfringence est immédiatement apparue et que dans le temps, cette biréfringence s'est développée en stries le long cette trajectoire. Un tel phénomène s'est reproduit lors des expériences que nous avons mené dans la 'random positioning machine' à Zurich (cf. Annexe 3). Lors du passage d'une bulle d'air, les microtubules sur la trajectoire de cette dernière sont orientés (Figure 32). La rupture de symétrie induite par la bulle suffit à déclencher au moins localement la réorganisation des microtubules sous forme de stries [Papaseit et al 2000, Tabony et al 2001-b, Tabony et al 2002-a, Tabony et al 2002-b].

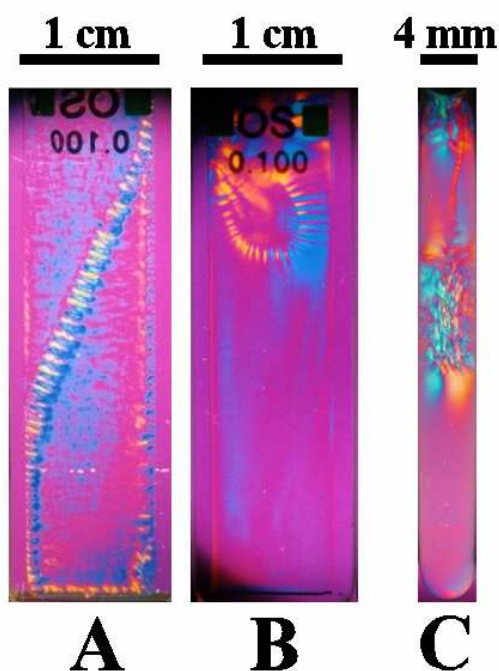


Figure 32. *L'auto-organisation des microtubules peut être provoquée par des bulles traversant des échantillons en microgravité. Dans des cuves rectangulaires en apesanteur lors du vol spatial (A), dans la RPM (B) et dans un tube RMN dans le clinostat 2D (C). On distingue nettement la trajectoire de chaque bulle car quelque temps après leur passage, les microtubules se réorganisent progressivement en stries tout au long de la ligne de cisaillement qu'elles ont créé. Ensuite, l'auto-organisation gagne peu à peu une bonne partie de l'échantillon.*

Au laboratoire, nous avons reproduit cette expérience avec des particules ferromagnétiques utilisées pour cisailier une solution de microtubules assemblés en conditions de pesanteur réduite. L'expérience était simple : elle consistait à préparer un tube RMN contenant 1 ml de solution 'standard' de tubuline et à le mettre dans un clinostat en rotation à 360°/s durant 20 minutes. A sa sortie, l'échantillon ne présentait aucune biréfringence. Si nous l'avions laissé se développer normalement, il ne se serait pas auto-organisé et n'aurait montré au mieux que quelques légers signes de biréfringence au bout d'une vingtaine d'heures. Cette

fois-ci, après l'avoir photographié à sa sortie, nous avons ajouté dans le col du tube, quelques billes ferromagnétiques d'environ 1 μm de diamètre. A l'aide d'un aimant, nous les avons attirées et nous leur avons fait traverser de part en part la solution encore non organisée. Immédiatement après cette opération, l'échantillon présentait une forte biréfringence sur le trajet des particules, indiquant que ces dernières avaient bien orienté localement les microtubules sur leur passage. Très rapidement en l'espace de 3 heures, une striation, bien que peu régulière, est apparue.

Le même résultat peut être obtenu avec n'importe quel cisaillement mécanique, comme par exemple en plongeant une fine pointe de seringue dans la solution.

Dans tous les cas précédemment décrits, on déplace un corps étranger massif dans une solution de microtubules de répartition uniforme et d'orientation isotrope. Un tel corps se comporte face au microtubules, objets de dimensions microscopiques, comme un véritable bulldozer. Il oriente ces fibres, comme on peut aisément orienter avec le bout du doigt un ensemble de baguettes (des spaghettis par exemple) disposées de façon uniforme sur une table et dont la direction moyenne est isotrope. Un cisaillement, en orientant seulement quelques microtubules, peut donc déclencher l'auto-organisation au moins partielle d'un échantillon. Comme pour les champs magnétiques, cette information est particulièrement importante pour confirmer notre hypothèse des bases moléculaires de l'auto-organisation.

3. Compensation par un champ magnétique

Les champs magnétiques ont une forte influence sur le processus d'auto-organisation. Suivant la façon selon laquelle ils sont appliqués, ils peuvent l'accélérer, le ralentir, voire l'empêcher complètement. Les gradients de champ magnétiques, donc la lévitation magnétique, agissent en simulant des conditions d'apesanteur au sol et ralentissent le processus. En revanche, les champs magnétiques ont, eux, une toute autre action : ils réorientent les microtubules dans l'axe du champ. Le couple magnétique agit donc au niveau individuel dans la population de microtubules. Nous avons vu précédemment que, le fait d'orienter ainsi quelques microtubules, brisait la symétrie de la réaction et déclenchait l'auto-organisation. De tels champs pourraient donc être envisagés comme un facteur correctif des dysfonctionnements et les pertes de fonctions cellulaires liés à l'apesanteur.

3.1. En lévitation magnétique sous champ intense

Une remarque que l'on peut faire est que dans le cas de la lévitation magnétique, donc en gravité très réduite, on aurait pu s'attendre à ne pas obtenir d'auto-organisation. Or, à cause de la rupture de symétrie provoquée par le champ magnétique, l'auto-organisation est quand même déclenchée. Les expériences que nous avons faites en éliminant au maximum l'effet du champ magnétique, ont montré que la réduction de gravité induite par la lévitation magnétique provoquait le ralentissement de l'auto-organisation mais ne l'empêchait pas et ce, à cause de la présence du champ magnétique. On peut donc considérer que le champ magnétique est suffisant pour déclencher l'auto-organisation d'une solution de microtubules placée dans des conditions telles qu'elle ne devrait pas s'auto-organiser, à savoir des conditions d'apesanteur. Le mécanisme de rupture de symétrie est connu dans ce cas et il diffère de celui mis en œuvre par la gravité. La rupture de symétrie provoquée par les champs magnétiques s'explique par l'orientation des microtubules dans l'axe du champ au début de leur croissance (cf. Section B.1.1 de ce chapitre).

3.2. En appliquant un champ magnétique sur une cuve en apesanteur simulée

Nous avons vu que sous l'effet d'un champ magnétique intense, les microtubules néoformés s'orientent dans l'axe de l'aimantation par couple magnétique. Par ailleurs, l'orientation qui est provoquée par un tel champ magnétique suffit à induire un changement de morphologie. Il est à supposer qu'en l'absence de gravité, un champ magnétique suffisamment intense pourrait suffire à provoquer l'auto-organisation d'une solution de microtubules. Nous avons donc appliqué un champ magnétique à des échantillons en apesanteur simulée.

Pour ce faire, trois petits aimants [Bakker Magnetics] de forte aimantation permanente (environ 350 mT au contact) ont été fixés au tube porte-échantillons en verre allant dans le clinostat avec une couche plastique isolant le tube du métal pour des questions d'isolation thermique. Une solution standard de tubuline a été placée dans des tubes RMN de 1 ml de contenance. C'est en effet dans ces tubes que nous sommes précédemment parvenus à empêcher le déclenchement de l'auto-organisation. Les échantillons ont été mis en rotation dans ces tubes, avec les aimants, à 360 °/s et durant 25 minutes. L'expérience a été répétée quatre fois. Des témoins ayant des plaques de métal de la dimension des aimants et remplaçant ces derniers, ont été faits avec ou sans rotation du clinostat.

Contrairement à ce qui était espéré, aucune auto-organisation ne s'est produite dans les échantillons en apesanteur simulée soumis au champ magnétique, exactement comme les échantillons témoins en apesanteur simulée, alors que les échantillons témoins à 1 g se sont développés correctement. Très vraisemblablement l'aimantation n'était pas suffisante. En effet, comme cela avait été déterminé dans l'expérience de changements de morphologies faite dans l'aimant horizontal, la valeur minimale pour obtenir un effet du champ est supérieure à 4 Teslas. Un champ de 350 mT ne suffit donc pas à rétablir l'auto-organisation des microtubules en apesanteur. Les expériences précédentes en champs magnétiques intenses avaient cependant été faites sur des échantillons qui allaient s'organiser de toutes façons, car soumis à l'action de la gravité; il avait donc fallu un champ intense pour que l'effet soit supérieur à celui de la gravité. Nous avons présumé que pour un échantillon qui ne devait pas s'auto-organiser, c'est-à-dire qui se développait en l'absence quasi-totale de champs externes, un champ magnétique de plus faible ampleur aurait été suffisant. De plus, des études concernant l'alignement des microtubules sous champ magnétique ont montré que des microtubules, exposés 10 minutes à un champ de seulement 200 mT, s'orientent, parallèles entre eux, dans l'axe du champ [Vassilev et al 1982]. Cela n'a pas été le cas dans notre expérience. Ces expériences avaient toutefois été faites entre une lame et une lamelle, donc dans une couche de solution très mince et avec l'aimant pratiquement au contact. Dans notre expérience, l'échantillon est volumineux par rapport à la portée des lignes de champ (celui-ci s'atténue très vite lorsqu'on s'éloigne de l'aimant). Le champ atteignant les microtubules n'a probablement pas suffi à les réorienter. L'observation des échantillons en biréfringence n'a effectivement pas révélé d'orientation préférentielle des microtubules.

Des expériences dans un champ magnétique intense seraient donc à envisager. Outre la difficulté de monter un clinostat thermostaté dans un appareillage aussi volumineux qu'un électroaimant, l'inconvénient dans ce cas serait que le champ resterait fixe, au contraire de l'échantillon qui serait en rotation. Si le champ est suffisamment homogène, comme c'est le cas dans ce type d'aimant, ce n'est pas gênant. En effet, les lignes de champ s'appliquant aux objets anisotropes en solution, en l'occurrence les microtubules, elles resteront invariantes par rotation et un couple magnétique s'exercera sur ces objets. Une telle expérience est donc réalisable car même si l'aimant reste fixe, les microtubules auront tendance à rejoindre leur position d'équilibre magnétique, c'est-à-dire l'axe des lignes de champ.

4. Rétablissement de l'auto-organisation sous l'action d'un champ de vibrations

Un autre moyen de rétablir l'auto-organisation par un champ externe, dans un échantillon en apesanteur, est de le soumettre à un champ vibratoire. Contrairement à la gravité qui est un champ d'accélération uniforme, unidirectionnel et de valeur non nulle, les vibrations sont des champs d'accélération périodiques, oscillants autour d'une position d'équilibre (ici l'axe de l'échantillon) et dont la moyenne est nulle. De tels champs vibratoires peuvent être générés par des moyens simples avec une membrane vibrante de haut-parleur ou bien avec un poids asymétrique disposé au bout d'un petit moteur électrique comme ceux que l'on trouve dans les téléphones portables (Figure 33 E). Les fréquences de vibration générées sont de l'ordre du Hz.

Comme pour l'expérience précédente avec les aimants dans le clinostat, nous avons fixé un vibreur de téléphone portable et sa pile à un tube porte-échantillons allant dans le clinostat. Une couche d'isolant thermique a été disposée entre l'appareillage et le tube porte-échantillons. La fréquence de vibration de l'appareil telle qu'elle a été mesurée par un enregistrement sonore avec un microphone était de 126 Hz (Figure 33 D). L'amplitude des vibrations, plus dure à mesurer, a été évaluée à une valeur de l'ordre du micron avec un comparateur micrométrique (l'amplitude est a priori inférieure à 1 μm).

Pour cette expérience encore, nous avons utilisé des tubes RMN remplis de 1 ml de solution standard de tubuline à 10 mg.ml⁻¹. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que la simple présence de l'appareillage ne provoquait pas l'auto-organisation de la solution de microtubules, par exemple par un effet sur le réchauffement de l'échantillon. Des témoins ont donc été placés dans ce tube en rotation durant 25 minutes dans le clinostat à 360°/s mais sans vibrations (vibreur éteint). Après être sortis du clinostat, nous avons laissé les témoins se développer durant plusieurs heures à 37°C. Aucune morphologie auto-organisée n'est apparue. En revanche, dans les échantillons placés dans le clinostat en rotation durant 25 minutes, à 360°/s, mais avec le vibreur en marche, des morphologies auto-organisées se sont développées dans tous les échantillons. Après 30 minutes, à la sortie du clinostat, les échantillons ayant subi des vibrations présentaient déjà une zone biréfringente d'environ 2 cm à l'emplacement du vibreur, alors que les témoins n'étaient pas du tout biréfringents. A partir de cette zone biréfringente, l'organisation a gagné tout l'échantillon. Les morphologies qui se sont formées étaient tout à fait semblables aux morphologies témoins obtenues à 1g et se sont formées à des vitesses comparables (Figure 33).

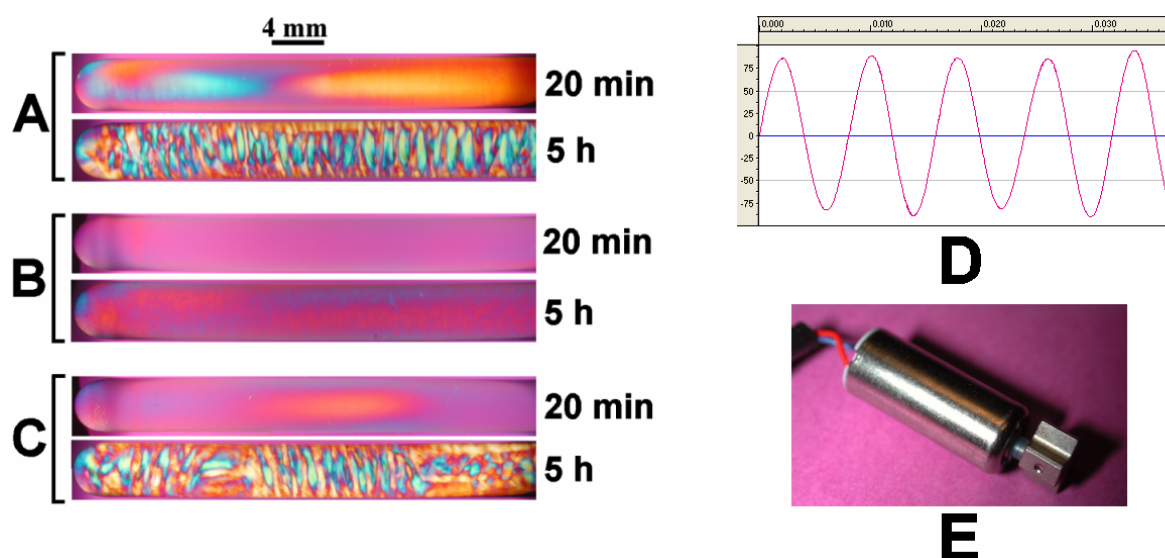


Figure 33. Effet correctif des vibrations sur des échantillons en apesanteur dans un clinostat 2D. Une solution mise en apesanteur 20 minutes dans un clinostat en rotation à $360^\circ/\text{s}$ ne s'auto-organise pas (B) contrairement à un échantillon qui se développe à 1 g (A). Lorsqu'on applique un champ de vibrations sur un échantillon en apesanteur, l'auto-organisation est rétablie (C). Les photographies ont été prises à la sortie du clinostat (20 min) et après 5 heures de développement. On distingue dans l'échantillon sous vibrations (C) une zone biréfringente s'apparentant à celle plus intense que l'on observe dans l'échantillon témoin (A). A droite un enregistrement chronographique de 37 millièmes de secondes de la vibration harmonique produite par le vibreur (D) et le vibreur de 2 cm fonctionnant avec un poids asymétrique (E).

On peut cependant s'interroger sur le processus qui conduit à l'auto-organisation des solutions de microtubules sous champ vibratoire. En effet, il faut rappeler que la moyenne du champ d'accélération généré est nulle. Plusieurs hypothèses sont à envisager.

En premier lieu, on peut supposer que le déclenchement de l'auto-organisation est provoqué directement par les accélérations très brèves dues aux vibrations, c'est-à-dire ne durant que $1/250^{\text{ème}}$ de seconde, soit une demi-période de vibration. On peut calculer ainsi une accélération maximale de l'ordre de 0.25 g , donc bien supérieure à la valeur minimale du seuil de déclenchement de l'auto-organisation (environ 10^{-2} g). Dans ce cas, il y a un rétablissement du processus d'auto-organisation réellement dû aux vibrations. Ceci est hautement probable, vu que l'accélération périodique du champ vibratoire est tout de même 25 fois supérieure à l'accélération uniforme de la pesanteur minimale requise.

Cependant, il est également possible qu'il existe une résultante non nulle, dirigée dans une direction privilégiée, de l'accélération due au champ de vibrations associé à la rotation du

tube. L'évolution de cette résultante serait donc une suite de pulses périodiques d'accélération dirigés dans une direction. Ce cas est à rapprocher de l'expérience précédemment décrite, utilisant la Free Fall Machine pour simuler des conditions d'apesanteur. Rappelons que dans cet appareil alternant des périodes d'apesanteur de l'ordre de la seconde et des pulses d'accélération vers le haut de 20 g durant une dizaine de millisecondes, les échantillons se sont auto-organisés normalement.

Enfin, bien que ce soit très peu probable au vu de la rigidité du tube en verre, des phénomènes de résonance peuvent amplifier davantage une composante résiduelle du champ d'accélération.

On ne peut malheureusement exclure ces deux dernières possibilités uniquement par des expériences au sol. Le seul moyen de vérifier ces hypothèses est d'envisager une expérience de vibration équivalente en apesanteur réelle, c'est-à-dire lors d'une expérience embarquée dans l'espace et excluant le dispositif du clinostat.

D. Conclusions des expériences sur les champs externes

Les résultats ont confirmé ce que nous savions sur la sensibilité des microtubules vis-à-vis de la gravité. Les expériences en clinostat ont étayé notre connaissance sur ce point, leur simplicité d'utilisation ayant permis de réaliser un grand nombre d'expériences et d'observer plus facilement les échantillons soumis à l'apesanteur que dans une expérience embarquée en fusée sonde. D'autres expériences ont montré que des gradients de champs magnétiques intenses, suffisants pour faire léviter les solutions de microtubules, ralentissent considérablement le processus d'auto-organisation. Les valeurs minimales d'intensité de champ (gravité ou champs magnétiques) nécessaires à l'auto-organisation, ainsi que les fenêtres temporelles d'action de ces champs ont été déterminées.

Dans le cadre des expériences en clinostat, d'autres effets pouvant déclencher l'auto-organisation, comme le rôle de la forme et des dimensions des échantillons, le cisaillement par des bulles ou des particules, ou encore un champ vibratoire, ont été observés. Les champs magnétiques intenses sont un facteur externe permettant de rompre la symétrie du processus de réaction-diffusion. Ces facteurs sont capables de provoquer la rupture de symétrie dans les solutions de microtubules même en l'absence de gravité.

Ces expériences de simulation d'apesanteur au sol avec des clinostats sont très simples à réaliser mais l'interprétation que l'on peut en faire, c'est-à-dire la compréhension de leur effet au niveau moléculaire est très compliquée. Dans ce cas, c'est le modèle qui nous donne des éléments de réponse sur la façon dont cela se fait. Inversement, pour ce qui est des expériences en champ magnétique et des expériences de cisaillement, leur mise en œuvre est plus complexe mais leur interprétation au niveau moléculaire est beaucoup plus simple. Une conclusion importante que l'on peut tirer de ces observations est que des champs magnétiques ou des corps étrangers massifs comme des bulles d'airs suffisent à provoquer l'auto-organisation en orientant quelques microtubules. Ceci est une indication importante que nous avons utilisé pour mettre en place les bases moléculaires de l'auto-organisation et alimenter ainsi le modèle.

Si l'auto-organisation des microtubules telle que nous la décrivons est responsable de l'organisation du cytosquelette et des fonctions associées dans les cellules vivantes, alors des 'facteurs déclencheurs' comme les champs magnétiques intenses ou un champ vibratoire pourraient fournir un moyen de corriger les effets néfastes dus à l'apesanteur. Ce résultat expérimental *in vitro* est à rapprocher des résultats qui ont été obtenus sur des êtres vivants placés en apesanteur: des dysfonctionnements comme l'ostéoporose ou un système immunitaire déficient ont été corrigés par l'application d'autres champs externes comme des vibrations [Eisman 2001, Rubin 2001]. Il est évident que cela trouve une application directe en thérapeutique, quand on pense à la forte proportion de personnes touchées par l'ostéoporose ou encore dans le domaine spatial pour corriger les effets de l'apesanteur dont souffrent les astronautes [LeBlanc et 1998].

MODÉLISATION ET SIMULATIONS

Chapitre 1 - Élaboration d'un modèle d'auto-organisation d'une population de microtubules

"Ceux qui se bornent à calculer, à peser, à mesurer se trompent souvent eux-mêmes; que sera-ce de ceux qui ne veulent que deviner" [Voltaire (b)]. M de Voltaire met en garde les penseurs à l'imagination fertile. Ces gens là ne prennent souvent pas la peine de vérifier leurs dires tant ils sont sûrs d'eux. Certes, la démarche de réflexion est utile au chercheur car elle élargit son champ de vue restreint au plus petit des systèmes pour le replacer dans un cadre conceptuel global. Souvent, cela lui permet d'en faire ressortir tout l'intérêt. L'interaction entre deux molécules biologiques *in vitro* n'a que peu d'intérêt si on ne la replace pas dans le contexte de la cellule et d'une façon générale dans le métabolisme cellulaire pris dans son intégralité. De plus, on peut se noyer dans les spéculations quant au rôle d'une telle interaction, mais celles-ci ne resteront que de peu d'utilité tant qu'elles n'auront pas été vérifiées. La démarche de réflexion doit donc être vérifiée soit par l'expérimentation soit par le calcul. C'est en ce sens que la modélisation est souvent utilisée : elle permet de vérifier les hypothèses que formule le chercheur alors qu'il observe un processus ou un comportement inconnu.

Revenons-en aux microtubules. Nous savions grâce aux nombreuses expériences antérieures réalisées au laboratoire que leur auto-organisation se faisait par des processus dissipatifs de réaction-diffusion [Tabony et coauteurs](cf. Partie introductive, 2^{ème} Chapitre, Section 2.2). Nous l'avons déjà dit, il restait à en comprendre les fondements moléculaires, c'est-à-dire faire le lien entre les microtubules individuels et la structure macroscopique observée. À partir des connaissances accumulées au laboratoire au cours d'une dizaine d'années d'expériences, et des données de la littérature sur les microtubules, un mécanisme moléculaire pour l'auto-organisation des microtubules a été progressivement établi [Communications privées (a)]. Mis dans un contexte de système collectif, ce mécanisme peut mener à l'auto-organisation des microtubules. C'est ce mécanisme que nous avons implémenté sous forme d'un modèle informatique. Une fois le modèle jugé satisfaisant, nous l'avons affiné et, en parallèle des expériences, nous y avons ajouté la simulation de l'action des champs externes et des autres facteurs pouvant rompre la symétrie de la réaction. Et, nous le verrons, c'est en définitive la complémentarité entre les expériences et les simulations numériques qui

a été dans ce travail l'élément déterminant dans la compréhension du processus d'auto-organisation en général.

En se plongeant un peu dans la littérature concernant les études cinétiques sur les microtubules et sur leur faculté d'organisation spatiale, on est frappé de constater que nombre de modèles mathématiques et informatiques ont été développés et il est légitime de se demander pour quelle raison. Sachant cela, pourquoi nous sommes nous lancé dans la conception d'un nouveau modèle mathématique sur les microtubules ?

Il y a deux principales raisons pour se lancer dans la construction d'un modèle, quel qu'il soit. Sa finalité est souvent celle d'un outil prédictif. Le but du modélisateur est donc dans ce cas de créer un modèle le plus proche possible de la réalité afin que les prédictions soient d'autant plus fiables. L'exemple le plus connu est celui des modèles météorologiques. Cependant, les modèles sont aussi d'un grand apport en recherche fondamentale pour comprendre un système et faire ressortir son fonctionnement, souvent parmi tout un éventail de possibilités. La modélisation permet par exemple, d'identifier un processus enzymatique et ses paramètres (constantes réactives, concentrations critiques ...).

Le système constitué par les solutions de microtubules est un cas particulièrement ardu à comprendre, tant sur le plan cinétique que sur le plan de l'organisation spatiale. En effet, dans ce système, le nombre de comportements possible est très élevé en fonctions des conditions d'expérience, ce qui complique la compréhension des mécanismes mis en œuvre, et l'identification de leurs paramètres. Il s'agit donc de comprendre comment un même système peut avoir un si grand nombre de comportements possibles quand on ne change que quelques paramètres réactifs comme par exemple la température, les concentrations ou encore la répartition initiale des constituants du système. Ceci justifie la quantité de modèles déjà faits sur les microtubules.

Nous savons par l'expérimentation que l'auto-organisation des microtubules est directement liée à leur réactivité [Tabony 1994, Communications privées (e)]. C'est un phénomène dissipatif [Tabony and Job 1990] impliquant des processus de réaction et de diffusion couplés entre eux [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Les théories comme celle de Turing et celle de Prigogine, nous ont permis de comprendre le processus d'auto-organisation et sa dépendance vis-à-vis des champs externes dans sa globalité, mais il nous manquait l'approche d'un point de vue moléculaire, c'est-à-dire en termes de microtubules individuels. Ceci satisferait l'approche moléculaire des chimistes et des biologistes, et surtout permettrait d'établir un lien entre les processus biologiques

macroscopiques, et la foule d'événements microscopiques non linéaires qui les constituent. C'est ces considérations qui nous ont amené à réaliser un modèle mathématique du processus d'auto-organisation microtubulaire.

Pour tenter d'expliquer l'auto-organisation des microtubules à une échelle moléculaire, une hypothèse a été avancée suite à de nombreuses discussions à ce sujet [Communications Privées (a)]. Selon cette hypothèse, les microtubules s'auto-organiseraient entre eux à la manière des fourmis. Les microtubules, en avançant par 'treadmilling', laisseraient derrière eux des traînées concentrées de tubuline. Ces traînées constitueraient de véritables rails, guidant la direction de croissance des microtubules voisins. Ainsi, les microtubules communiqueraient entre eux par le biais de ces traces chimiques en 'recherchant' les régions les plus concentrées en tubuline. À partir d'une telle hypothèse, on comprend bien que si l'on oriente, d'une façon ou d'une autre, quelques microtubules dans une direction privilégiée, c'est l'ensemble de la population qui va s'auto-organiser comme un ensemble collectif. Les expériences que nous avons faites renforcent cette explication. En effet, nous avons bien vu, grâce aux expériences en champs magnétiques intenses et grâce aux expériences de cisaillement, que le fait d'orienter quelques microtubules dans une direction privilégiée, déclenche le processus d'auto-organisation.

La modélisation de l'auto-organisation fondée sur une telle hypothèse, ainsi que son implémentation informatique, requiert une simulation de chacun des microtubules d'une large population.

Le modèle simule donc l'évolution d'une population de microtubules ayant chacun une cinétique réaliste propre (assemblage et désassemblage à chaque extrémité), et pouvant communiquer entre eux par l'intermédiaire de la tubuline libre de diffuser. Le problème qui s'est donc posé consistait à décrire le comportement individuel des microtubules, et même plus précisément le comportement individuel de chacune de leurs extrémités. La question était alors de savoir si nous souhaitions nous attaquer à un énième modèle de cinétique microtubulaire. On peut effectivement passer beaucoup de temps à tenter d'élucider les mystères de leur cinétique. Nous pouvions aussi nous limiter à reproduire un comportement individuel physique et cinétique qui nous semblait le plus réaliste possible. Ce comportement individuel serait alors attribué à chacun des individus simulés dans un modèle de type 'système collectif' spatio-temporel. C'est cette voie que nous avons choisie. Nous verrons que malgré une cinétique individuelle encore loin d'être parfaite, nous parvenons à reproduire la plupart des comportements cinétiques et d'organisation globaux que l'on peut observer expérimentalement.

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter le schéma général et les bases moléculaires du mécanisme que nous pensons être au fondement de l'auto-organisation. Ensuite seulement, nous présenterons le modèle. Vu dans sa totalité, celui-ci peut paraître bien compliqué, car sa conception requiert un grand nombre d'aspects différents. Chacun d'entre eux sera détaillé dans un paragraphe consacré aux aspects généraux du modèle. En fait, cela concerne à la fois la façon dont est représenté le modèle et la façon dont il fonctionne, et ce, sans se soucier de l'aspect cinétique des microtubules. Un paragraphe entier sera ensuite nécessaire pour expliquer la façon dont ont été modélisés les différentes composantes constituant la cinétique microtubulaire individuelle.

Le chapitre suivant sera consacré à l'analyse des résultats expérimentaux et à leur comparaison avec ce qui est observé expérimentalement *in vitro* ou *in vivo*. Nous montrerons que le modèle que nous avons élaboré permet de reproduire l'essentiel de ces observations.

1. Bases moléculaires de l'auto-organisation

Les quelques millions ou milliards de microtubules qui évoluent dans une solution contenant de la tubuline et du GTP consomment tous le même pool de tubuline-GTP et rejettent tous dans le milieu de la tubuline-GDP. La plupart des modèles concernant les microtubules se contentent d'une telle vision globale car ils ne cherchent seulement qu'à reproduire la cinétique de la solution entière de microtubules [Bayley et al 1989, Marx and Mandelkow 1994, Sept et al 1999]. On parle alors de concentration en microtubules, en tubuline-GTP libre, en tubuline-GDP libre dans la solution. Il n'existe donc dans ces modèles aucune individualité des microtubules, et la notion d'espace n'apparaît pas. En effet, il semble la plupart du temps comme acquis (ou oublié ?) que les microtubules sont dans un environnement chimique constamment uniforme globalement et homogène localement. Ce n'est pourtant pas le cas car chaque microtubule modifie localement son environnement au niveau de ses deux extrémités réactives. Et, au niveau macroscopique, il serait aberrant de penser que la concentration en tubuline libre puisse être uniforme, car il est évident que la présence de fortes variations périodiques de la concentration en microtubules [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000] modifie en conséquence le profil de concentration en tubuline libre : là où les microtubules sont nombreux, la consommation de tubuline est élevée et réciproquement. Bien évidemment de tels modèles ne peuvent mettre en évidence les

propriétés d'auto-organisation des microtubules. Pour cela, il faut individualiser les microtubules.

La question fondamentale que l'on se posait était donc de savoir comment se faisait l'auto-organisation au niveau moléculaire, c'est-à-dire à partir des microtubules individuels. Nous venons de l'évoquer, l'hypothèse qui a été progressivement retenue était que les microtubules s'auto-organisent entre eux à la manière des colonies de fourmis. C'est en s'inspirant de cette hypothèse et en s'appuyant sur les observations et données obtenues par l'expérimentation, que le modèle, que nous allons maintenant présenter, a été élaboré.

Le schéma réactionnel de la formation des microtubules est le suivant. La tubuline est incorporée dans les microtubules sous la forme du complexe tubuline-GTP. Cela se produit soit lors de la nucléation de nouveaux microtubules, soit lors de l'élongation au niveau des extrémités des microtubules déjà formés. L'addition de la tubuline implique l'hydrolyse du GTP en GDP. Cette réaction se produit peu après que la tubuline-GTP se soit fixé. Le microtubule est donc très majoritairement constitué de tubuline-GDP. De la même façon, lorsque de la tubuline est libérée depuis une extrémité, c'est le complexe tubuline-GDP qui est relâché. Quand un microtubule s'allonge à une extrémité et raccourci de l'autre, il se déplace. C'est le phénomène de 'treadmilling'. L'extrémité décroissante libère derrière elle une 'traîne' composée de tubuline-GDP fortement concentrée. Inversement, quand elle s'allonge, l'extrémité croissante incorpore de la tubuline 'à l'avant' du microtubule et cela crée une zone localement déplétée en tubuline-GTP.

Le complexe tubuline-GTP favorise la croissance des microtubules tandis que le complexe tubuline-GDP l'inhibe. Une fois libérée, la tubuline inactive (tubuline-GDP) est progressivement régénérée en tubuline-GTP par échange de la molécule de GDP fixée à la tubuline avec une molécule de GTP libre. La tubuline ainsi régénérée peut être à nouveau incorporée dans l'extrémité croissante d'un microtubule. Durant ce temps, la tubuline est libre de diffuser. S'il n'y a pas de diffusion, la tubuline régénérée se retrouve toujours dans la même trace se situant au même endroit que le microtubule désassemblé dont elle provient. De plus, les microtubules qui croissent ou se reforment avec cette tubuline, le font exactement dans la même trace. En conséquence, après que les microtubules se sont initialement formés, la solution reste isotrope et homogène et aucune auto-organisation ne se fait. Si au contraire, la diffusion de la tubuline est très élevée, alors, durant la durée de la conversion de la traînée concentrée de tubuline-GDP en tubuline-GTP, la solution redevient homogène en tubuline-GTP. N'ayant plus de direction privilégiée pour croître, les microtubules se reforment ou

croissent selon des directions aléatoires et, encore une fois, aucune auto-organisation n'émerge de la masse de microtubules. Cependant, si la diffusion de la tubuline est intermédiaire entre ces deux extrêmes, alors l'auto-organisation peut se faire. La tubuline diffuse progressivement depuis les traînées concentrées de tubuline laissée par les extrémités décroissantes des microtubules. Les microtubules voisins en train de croître se dirigent alors vers ces zones et continuent de croître dans ces véritables rails chimiques. De la même façon, la nucléation des microtubules est meilleure dans ces zones riches en tubuline-GTP. Tous ces microtubules qui se sont ainsi regroupés dans les traces laissées par d'autres microtubules produisent eux aussi des traînées concentrées de tubuline-GTP qui serviront elles-mêmes à organiser d'autres microtubules; et ainsi de suite.

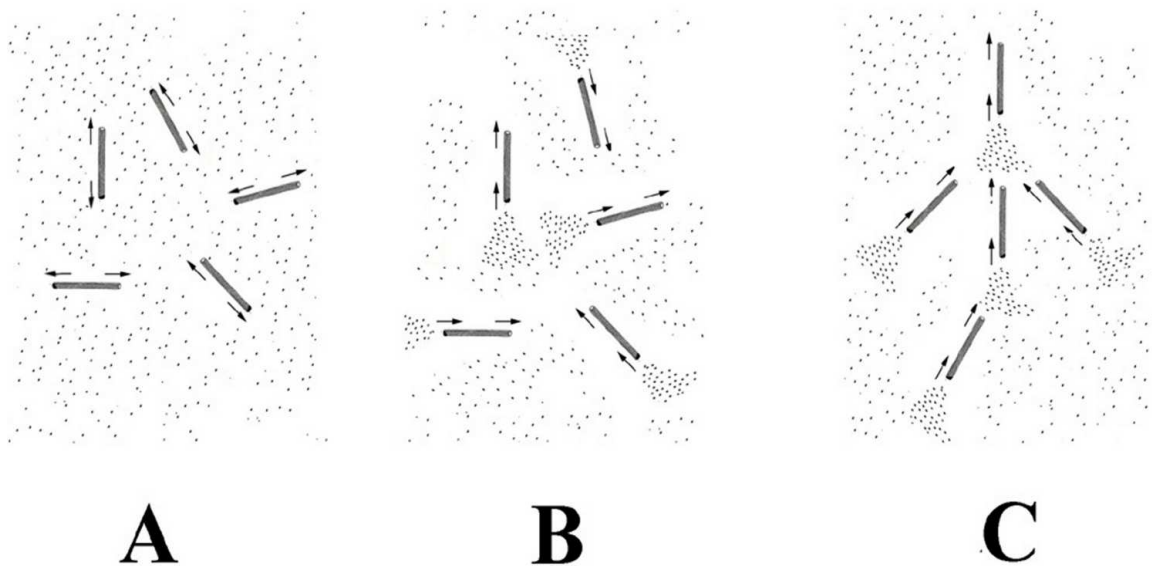


Figure 34. Schéma de l'auto-organisation des microtubules par des processus collectifs. Initialement, la solution étant uniforme, les microtubules qui viennent de se former s'allongent à leurs deux extrémités. Leur arrangement est isotrope (A). Au moment de bifurcation, la solution devient chimiquement instable et le désassemblage commence. Les microtubules libèrent donc au niveau de leurs extrémités décroissantes des traînées concentrées de tubuline (B). Les microtubules auront tendance à se former préférentiellement puis à croître dans ces traînées de tubuline (C). Si quelques microtubules ont une orientation privilégiée au moment de bifurcation, alors l'ensemble des microtubules va s'orienter de façon collective. Le moindre petit effet, comme la gravité, qui induit un biais directionnel dans la solution, va déclencher l'auto-organisation.

Si ce processus peut se renforcer, c'est parce que les zones qui contiennent des microtubules 'aspirent' littéralement la tubuline libre. 'L'aspiration' de la tubuline libre est due au fait que les extrémités croissantes des microtubules créent des zones de déplétion en tubuline-GTP. Par diffusion, les déplétions de tubuline sont peu à peu comblées. Ces zones contiennent alors le double de la quantité de tubuline qu'il y avait avant le passage du microtubule : elles contiennent la tubuline intégrée au microtubule, plus la même quantité de tubuline libre qui a comblé la déplétion induite par le microtubule et qui provient du voisinage par diffusion. L'augmentation de la quantité de tubuline libre dans ces zones induit la formation de nouveaux microtubules, et ainsi de suite le processus se renforce de lui-même.

C'est ainsi que les microtubules 'parlent entre eux': ils ne communiquent entre eux que par l'intermédiaire des molécules de tubuline libre de diffuser dans l'environnement (Figure 34). Le couplage entre les réactions et la diffusion de la tubuline amène progressivement à un comportement collectif qui aboutit à l'émergence de l'auto-organisation.

On conçoit que, par le mécanisme que nous avons proposé, on aboutisse de proche en proche à l'auto-organisation complète de tout l'échantillon. Ce n'est pourtant pas le cas, sinon comment expliquer l'absence d'auto-organisation en apesanteur. En fait, il ne faut pas oublier à quelle échelle on regarde ce processus. Les microtubules sont des structures de longueur à peine microscopique. L'échantillon, lui, à des dimensions macroscopiques de plusieurs millimètres voire centimètres. La communication des microtubules reste locale. Seules de petites zones auto-organisées à une échelle microscopique peuvent apparaître. À une échelle macroscopique, on ne verra cependant aucune auto-organisation, l'orientation générale des microtubules dans la solution restant en moyenne isotrope. Localement, si seulement quelques microtubules prennent une orientation privilégiée, les microtubules voisins vont se réorganiser pour croître dans la même direction. Sachant cela, si un effet externe induit un biais directionnel même léger, s'appliquant à tout l'échantillon, par exemple l'orientation dans une seule direction de quelques microtubules dans la solution, alors cet effet induira l'auto-organisation de l'échantillon tout entier. C'est le cas lorsqu'une bulle oriente les microtubules assemblés en traversant l'échantillon ou quand les microtubules néoformés sont réorientés sous l'action du couple magnétique dans un aimant de forte intensité. La gravité, nous le verrons, agit également dans ce sens, par son interaction directionnelle sur les fluctuations de densité présentes dans la solution à un moment critique du processus.

2. Aspects généraux du modèle

En 1990, C. Robert et al [Robert et al 1990] ont proposé un modèle simple pour simuler l'auto-organisation des microtubules. Ce modèle comportant une dizaine de microtubule reposait sur la croissance des microtubules et sur la diffusion de la tubuline. Dans ce modèle, il n'existe pas de cinétique à proprement parler, l'extrémité croissante se contentant de rechercher les gradients élevés de tubuline libre et de la consommer en avançant. De plus, les microtubules sont réduits à la simple expression d'une seule extrémité ne pouvant que croître. La possibilité de désassembler n'étant pas programmée. Ce que l'on visualise, c'est le tracé de cette extrémité au cours du temps. De plus, leur nombre et leur position de départ étaient initialement définis : les microtubules ne pouvaient pas être spontanément nucléés à partir de la solution de tubuline; leur position et leur orientation initiale étaient prédéfinies, de façon à représenter un centriole. Cependant, le modèle de C. Robert & al avait le mérite d'introduire le principe de réaction-diffusion pour modéliser l'auto-organisation spatiale des microtubules. Ce modèle est toutefois insuffisant pour générer des structures stationnaires complexes comme des morphologies striées. De plus, il n'apporte aucune donnée d'ordre cinétique que l'on pourrait comparer à des résultats expérimentaux. Enfin, la question de l'action de champs externes faibles et autres perturbations sur des populations de microtubules n'a pas été abordée dans ce travail.

Avec notre modèle, nous avons pu simuler l'évolution spatio-temporelle d'une population constituée d'un grand nombre de microtubules (de quelques milliers à 1 million) sur un espace réactionnel bidimensionnel de plusieurs centaines de micromètres de côté (jusqu'à 400 μm x 400 μm). Les simulations se font dans un espace réactionnel décrit par un ensemble de 2 tableaux bidimensionnels représentant les concentrations des molécules de tubuline-GTP et de tubuline-GDP. L'évolution de position et d'orientation de chaque microtubule sur l'espace réactionnel, ainsi que l'évolution des concentrations de tubuline-GTP et de tubuline-GDP en chacun de ses points, est calculée tous les centièmes de seconde du temps de réaction ($dt=0.01$ s). Les microtubules, objets indépendants les uns des autres, évoluent donc sur un espace réactionnel discrétisé et modifient au gré de leurs passages les profils des concentrations en tubuline libre.

En ce qui concerne le comportement des microtubules, nous nous sommes appliqués à respecter au mieux à la fois les bases moléculaires que nous avons proposées et l'ensemble des connaissances sur les microtubules. Ainsi, dans notre modèle, les microtubules peuvent

s'allonger ou se raccourcir depuis chacune de leurs deux extrémités. Les dimères de tubuline-GTP sont ajoutés aux extrémités croissantes des microtubules à des vitesses dépendant de leur vitesse maximale d'assemblage et des concentrations locales en tubuline-GTP. Les extrémités décroissantes, elles, libèrent localement de la tubuline-GDP. Au même titre que la tubuline-GTP, la tubuline-GDP libérée diffuse dans le milieu environnant avec une constante de diffusion donnée. Le milieu réactionnel est supposé être en large excès de GTP. Cela permet la régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP à une vitesse constante donnée. La tubuline-GTP nouvellement régénérée, peut alors être incorporée dans les extrémités croissantes des microtubules voisins ou bien servir à la nucléation de nouveaux microtubules. Les microtubules sont nucléés localement, à partir de la tubuline libre, à une vitesse dépendante de la concentration locale de tubuline-GTP, leur orientation initiale n'étant pas initialement fixée. Quand les microtubules s'allongent à partir de leur position initiale, ils peuvent dans une certaine limite modifier leur direction de croissance. Ceci se fait en fonction des gradients de tubuline-GTP présents à l'extrémité croissante. Les simulations numériques incluent les effets de conditions aux limites dans l'espace de réaction. La description de la croissance et du raccourcissement au niveau des extrémités des microtubules englobe les deux comportements cinétiques extrêmes qu'ils peuvent adopter, à savoir le treadmilling et l'instabilité dynamique. Les relations qui décrivent le comportement des extrémités des microtubules et qui unissent ces comportements sont de type non linéaires. Les vitesses de réaction [Horio and Hotani 1986, Melki et al, 1988, Walker et al 1988, Gildersleeve et al, 1992, Marx and Mandelkow, 1994, Vandecandelaere et al, 1995, Odde et al 1997, Tran et al, 1997] et de diffusion [Salmon et al 1984, Odde et al 1997] utilisées dans les simulations sont cohérentes avec les observations expérimentales. L'ensemble des caractéristiques du modèle est détaillé ci-dessous.

2.1. Représentation des microtubules

Il n'est nullement nécessaire de connaître la forme des mandibules d'une fourmi pour comprendre comment elle va se déplacer sur le terrain au gré des gradients de phéromones laissés par d'autres fourmis. De la même façon, nous n'avons également aucunement besoin de savoir quelle est la structure fine des microtubules pour comprendre comment ils vont évoluer dans l'environnement complexe de tubuline créé et entretenu par l'ensemble des microtubules. En revanche, il est nécessaire de connaître la façon dont un microtubule individuel interagit avec son environnement et le modifie. Une fourmi modifie son environnement sur son

passage en déposant ses phéromones ou en prélevant de la nourriture. Le terrain sur lequel elle évolue est modifié tout au long de sa trajectoire qui peut s'avérer très sinueuse. Ceci est possible car la fourmi peut être confondue avec un objet ponctuel. En revanche, la forme allongée d'un microtubule impose que son action sur l'environnement soit limitée par cette contrainte. Ses deux extrémités, en effet, ne sont pas des points réactifs libres de tout mouvement ; leur évolution doit se faire selon l'axe (plus ou moins souple) du microtubule. Il était donc nécessaire d'intégrer cette information spatiale en modélisant non pas des objets ponctuels réagissant dans le milieu, mais des tiges dont chaque extrémité réagit dans le milieu.

Dans la réalité, les microtubules sont des objets fibrillaires. On peut les associer à des fibres relativement souples. Ces fibres sont capables de s'allonger ou de se raccourcir à leurs 2 extrémités selon une dynamique qui est propre à chaque extrémité et qui dépend des conditions locales (concentrations, obstacles...) rencontrées par chacune de ces extrémités. Nous avons donc donné aux microtubules simulés l'aspect et le comportement physique et réactif le plus proche de la réalité, c'est-à-dire que nous les avons représentés comme des tiges d'une certaine rigidité avec deux extrémités réactives. Chacun de ces objets contient tout son historique, c'est-à-dire la quantité de tubuline intégrée en chacun de ses points. L'absence d'une telle représentation, par exemple dans le modèle de C. Robert & al [Robert et al 1990], n'autorise pas le désassemblage des microtubules, donc la formation de traînées concentrées de tubuline, un des aspects fondamentaux de l'auto-organisation microtubulaire.

Les microtubules ont donc été modélisés comme des objets indépendants les uns des autres. Comme les microtubules sont de longues structures, nous les avons discrétisés. Ils sont donc constitués d'éléments de volume reliés entre eux pour former un objet articulé. Le nombre d'éléments n'est pas fixe. Les microtubules en contiennent un ou plusieurs, en fonction de leur taille qui varie dans le temps. Les extrémités sont des zones à la réactivité très variable, donc elles sont constituées d'éléments de taille variable. Par contre, le corps du microtubule est composé d'éléments de taille fixes de 1 μm de long. Les 2 extrémités sont rattachées de part et d'autre du corps du microtubule (Figure 15).

Au cours de la simulation, la taille d'un microtubule varie, parfois dans des proportions élevées. Lorsqu'un microtubule croît à une extrémité, il consomme localement de la tubuline-GTP. Cette quantité de tubuline est ajoutée à l'élément de volume variable constituant l'extrémité. On parle alors de tubuline intégrée au microtubule ou de tubuline assemblée. Lorsque cet élément contient une quantité de tubuline correspondant à 1 μm de microtubule (soit 1625 molécules de tubuline), alors l'élément d'extrémité devient un élément

constant du corps du microtubule et un nouvel élément de taille variable est ajouté à l'extrémité. Le nouvel élément contient une quantité nulle de tubuline lorsqu'il est ajouté. De la même façon que pour l'élément précédent, ce dernier va pouvoir grandir par ajout de nouvelles molécules de tubuline. L'ajout de nouveaux éléments dans un microtubule peut se faire tant que les conditions sont favorables et surtout tant que l'extrémité croissante ne rencontre pas d'obstacle, comme par exemple une des parois de l'environnement réactif. Quand c'est le cas, la croissance du microtubule au niveau de l'extrémité concernée est stoppée et aucun nouvel élément n'est ajouté.

Inversement, l'extrémité d'un microtubule peut, du fait de conditions environnementales défavorables, se désassembler en libérant localement dans le milieu de la tubuline-GDP. Cette tubuline provient directement de l'élément variable de microtubule, situé à l'extrémité en train de se raccourcir. Quand la quantité de tubuline intégrée dans cet élément atteint la valeur nulle, alors cet élément est détruit et c'est l'élément suivant de $1\ \mu\text{m}$ qui jusque là faisait partie du corps du microtubule, qui devient le nouvel élément de taille variable à l'extrémité. Le processus de désassemblage peut alors se poursuivre sur cet élément. Lorsqu'il ne reste plus qu'un seul élément au microtubule et que celui-ci, à force de désassemblage, ne contient plus de tubuline, alors le microtubule est détruit.

2.2. L'environnement chimique des microtubules

L'environnement dans lequel évoluent les microtubules simulés est un espace discrétisé en 2 dimensions. Deux tableaux, chacun en deux dimensions, contiennent les valeurs des concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP en tout point de l'espace. C'est dans un tel espace réactionnel que les microtubules évoluent. Les molécules de tubuline qui sont stockées dans ces grilles servent à calculer la croissance des extrémités des microtubules où qu'elles se situent dans l'espace de réaction. Réciproquement, les microtubules modifient sur leur passage ces grilles de concentration.

2.2.1. Formes, dimensions et maillage de l'environnement

La discrétisation de l'espace est telle que chaque case des tableaux représente un carré de $1 \times 1\ \mu\text{m}$. Cela peut paraître immense par rapport aux dimensions des microtubules qui sont de l'ordre de quelques micromètres de long pour 24 nm de diamètre. C'est aussi un maillage très fin au vu de l'échelle macroscopique des morphologies auto-organisées que nous

avons précédemment décrit. De plus, réduire la taille du maillage augmente fortement les temps de calcul, non seulement parce que le nombre de point d'espace à calculer est plus élevé pour une même surface, mais surtout parce que, lorsqu'on réduit le pas d'espace, on doit pour des raisons de stabilité numérique, réduire en conséquence le pas de temps. Des simulations ont montré que le comportement des populations simulées de microtubules est semblable lorsqu'on utilise des maillages de plus grande finesse (0.5 μm et 0.1 μm). Ce compromis, entre la taille de l'échantillon que nous souhaitons simuler et la durée des calculs pouvant être très longue (plusieurs semaines), paraît le bon.

L'environnement est de dimension finie et des parois délimitent son contour. Ces zones sont des endroits où la symétrie de la réaction est rompue : les microtubules ont un comportement particulier à leur niveau car non seulement leur avancée est physiquement stoppée par les parois, mais également ils 'sentent' davantage les modifications des concentrations en tubuline libre qu'ils provoquent eux-mêmes. Lorsqu'un microtubule consomme de la tubuline-GTP, il crée une déplétion locale dans l'environnement. L'effet de cette déplétion se propage autour de l'endroit au niveau duquel elle est créée. Si cet endroit se situe tout contre une paroi, alors l'effet de la déplétion ne pourra pas se propager dans une direction et sera en conséquence plus forte dans la direction contraire. De ce fait, un microtubule est capable de 'sentir' les parois de l'échantillon à distance, car il 'sent' lui-même l'effet de la déplétion qu'il provoque.

Bien que le maillage de l'environnement reste carré et que sa forme n'évolue pas en cours de simulation, les formes et propriétés que nous pouvons initialement donner à notre environnement sont très variées. Sa forme peut être carrée, rectangulaire ou ronde. On peut aussi lui donner n'importe quelle autre forme, comme celle d'une structure biologique, par exemple une cellule, ou encore disposer dans l'environnement des obstacles simulant des structures biologiques, comme le noyau cellulaire. Chacune de ces formes particulières contribuera à rompre la symétrie de la réaction d'une façon spécifique.

D'une façon générale toutefois, on peut choisir, dans les simulations, de rompre de cette façon la symétrie ou bien de ne pas la rompre. Dans ce dernier cas, il suffit d'enlever les parois et obstacles de l'environnement en créant un environnement torique : les parois 'droite' et 'gauche' sont fusionnées ainsi que les parois 'haute' et 'basse'. Ceci est fait de telle façon qu'un microtubule qui s'allonge en direction d'une des limites de l'environnement ne s'arrête pas et continue son assemblage en la traversant. Prenons un exemple : un microtubule dans un environnement de largeur ' X_{max} ', se dirige vers la paroi gauche, donc vers les points

d'abscisse $x=0$. Si bien sûr les conditions sont favorables, il continue son assemblage en traversant la limite gauche. On retrouve alors son extrémité, en croissance, toujours dans la direction droite vers gauche, au niveau de la limite droite de l'environnement, c'est-à-dire au niveau des points d'abscisse $x = X_{\max}$. Le principe s'applique bien entendu également à la diffusion des molécules libres de tubuline.

Enfin, même si ce point n'est pas essentiel dans le modèle, signalons tout de même que nous pouvons attribuer des propriétés indépendamment à chacun des points de l'environnement. Des fonctions de synthèse ou de dégradation de tel ou tel type de réactif peuvent être attribuées à certains endroits de l'environnement. Nous avons utilisé ces possibilités pour simuler l'auto-organisation dans des conditions mimant celles d'une cellule.

2.2.2. Évolution de la réaction dans l'environnement chimique

Deux types d'opérations modifient l'environnement. Il y a les opérations globales qui s'appliquent à tout l'environnement, comme la diffusion de la tubuline libre ou la régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP : à chaque laps de temps de simulation, on calcule en tout point la mise à jour des grilles de concentration en tubuline-GTP et en tubuline-GDP après régénération et diffusion des molécules de tubuline. Il y a aussi les réactions qui ne s'appliquent qu'en certains points de l'espace. C'est le cas des endroits où se trouvent des extrémités de microtubules.

Lorsqu'un microtubule croît depuis une extrémité, il consomme localement de la tubuline-GTP. Lorsque, au contraire, il décroît, il rejette localement de la tubuline-GDP. Chacun des éléments 'i' composant un microtubule possède des coordonnées (x_i, y_i) qui renseignent sur leur position dans l'espace de réaction. Les coordonnées des extrémités donnent la position au niveau desquelles les quantités de tubuline-GTP ou de tubuline-GDP sont modifiées dans les tableaux de concentration (Figure 35). Ce calcul est effectué durant chaque laps de temps 'dt' de la simulation pour toutes les extrémités de tous les microtubules.

Précisons que cette opération a été parallélisée. Dans un calcul séquentiel, on modifie progressivement l'environnement de tubuline en calculant les microtubules les uns après les autres. Une telle façon de procéder risque de générer notamment des effets de retard dans la formation des structures auto-organisées. C'est ce que l'on observe lorsque l'on voit des ondes spirales se former dans les colonies de *Dictyostelium discoideum* ou lors de la propagation des ondes d'excitation dans le muscle cardiaque. D'une onde initialement concentrique se propageant de proche en proche peut naître une onde spirale lorsque l'on

introduit un léger retard de propagation à un endroit de l'onde. La parallélisation empêche de tels phénomènes artéfactuels de se produire. Pour cela, on calcule l'évolution de chacun des microtubules en mémorisant les variations qu'ils provoquent dans l'environnement, mais on n'applique ces variations sur l'environnement seulement après que le calcul est terminé. Cela équivaut à calculer l'évolution de tous les microtubules en même temps.

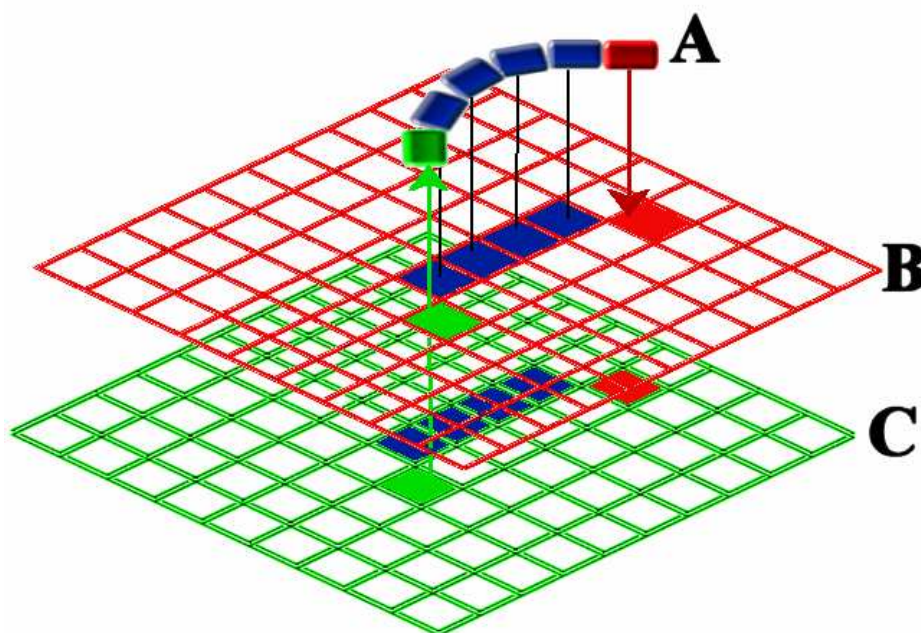


Figure 35. Schéma de l'évolution d'un microtubule simulé (A) dans l'environnement de tubuline-GTP (C) et de tubuline-GDP (B). Le microtubule est régulièrement divisé en sections de 1 μm chacune. L'extrémité croissante du microtubule correspond à la section verte, et l'extrémité décroissante à la section rouge. Chaque élément du microtubule à une position dans l'espace qui correspond à une coordonnée dans le tableau de tubuline-GTP et dans le tableau de tubuline-GDP (cases colorées). Quand une extrémité s'accroît, elle consomme de la tubuline-GTP dans le tableau de tubuline-GTP (C) et quand au contraire elle se désassemble, elle libère de la tubuline-GDP dans le tableau correspondant (B). Quand le microtubule s'agrandit ou se raccourci au niveau d'une extrémité, un élément est ajouté ou enlevé à cette extrémité à chaque micromètre.

2.3. La diffusion de la tubuline

La diffusion de la tubuline est un point sensible du modèle car c'est elle qui permet aux microtubules de communiquer entre eux. Dans notre modèle, nous avons admis que seule les molécules libres de tubuline (tubuline-GTP et tubuline-GDP) sont capables de diffuser. Dès

lors que la tubuline est assemblée sous forme de nuclei ou de microtubules, elle ne diffuse plus. Les assemblages macromoléculaires qui se forment à partir de la tubuline deviennent en effet beaucoup trop gros et trop longs pour pouvoir diffuser. La constante de diffusion de la tubuline, $D_{Tubuline}$, utilisée aussi bien pour la diffusion de la tubuline-GTP que pour celle de la tubuline-GDP, a pour valeur $6.10^{-8} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, comme cela a été mesuré par Salmon et al [Salmon et al, 1984].

Au cours d'une simulation, la diffusion des molécules tubuline libre est calculée à chaque pas de temps ' dt ', c'est-à-dire toutes les 0.01 s. Chaque point de la grille de réaction est mis à jour après un calcul de diffusion discrétisé comme suit. La méthode choisie est celle des différences finies au 1^{er} ordre. Dans un maillage carré, chaque case de l'environnement, nommée cellule, est entourée de 8 voisines, une en dessus, une en dessous, une à droite et une à gauche, les autres dans les coins diagonaux. Ce sont les 4 premières qui nous intéressent dans cette méthode. On note $C_{i,j}$ la concentration du point au niveau duquel on souhaite calculer la diffusion. Le point supérieur est noté $C_{i,j+1}$, inférieur $C_{i,j-1}$, de droite $C_{i+1,j}$, de gauche $C_{i-1,j}$. L'équation de diffusion s'écrit alors

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{i,j+1} + C_{i,j-1} + C_{i+1,j} + C_{i-1,j} - 4 \cdot C_{i,j}) \quad (1)$$

, avec $D_{Tubuline}$ la constante de diffusion de la tubuline. Cette équation simule la diffusion isotrope de la tubuline durant le laps de temps ' dt ' et sur une distance ' dx ' autour du point de coordonnées (i,j).

En ce qui concerne les conditions aux limites : Lorsque l'environnement est de forme torique, c'est-à-dire exempt de parois imperméables, il faut assurer la contiguïté de l'espace réactif dans le calcul de la diffusion. Dans ce cas, lorsqu'on calcule la diffusion au niveau d'une des limites de l'environnement, certaines cellules voisines se situent à distance. Par exemple, si la cellule $C_{i,j}$ est collée à la paroi gauche (donc en un point quelconque de coordonnées (0,j), $0 < j < Y_{max}$) dans un environnement bidimensionnel de dimensions (X_{max} , Y_{max}), alors l'équation de la diffusion en ce point s'écrit

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{0,j+1} + C_{0,j-1} + C_{1,j} + C_{X_{max},j} - 4 \cdot C_{0,j}) \quad (2)$$

On peut aussi choisir de laisser les parois et même de rajouter des obstacles dans l'environnement. Dans ce cas, on part du fait que la diffusion ne se fait pas à travers les parois

de verre imperméables. On applique donc des conditions dites de flux nul, ou conditions de Von Neumann, telles que $\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{x=0} = 0$. Par exemple, avec une paroi à gauche, l'équation devient,

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{i,j+1} + C_{i,j-1} + 2 \cdot C_{i+1,j} - 4 \cdot C_{i,j}) \quad (3)$$

Lors des simulations, nous avons mis en évidence la présence d'un biais numérique lié à la méthode de calcul de la diffusion de la tubuline. La méthode des différences finies génère des fronts d'onde carrés ; le front de diffusion de la tubuline à partir d'un point initial n'est pas égal dans toutes les directions de l'espace, c'est-à-dire n'est pas parfaitement circulaire. Ce problème est lié au fait que lorsqu'il y a un retard dans la diffusion des cellules dans la direction diagonale du point d'origine par rapport aux cellules situées dans les directions verticales et horizontales. Durant le laps de temps 'dt', la matière qui diffuse est distribuée dans les cellules voisines se situant directement en dessus, en dessous, à droite et à gauche du point d'origine. Ce n'est qu'au laps de temps suivant que les points situés dans les diagonales sont atteints (Figure 36).

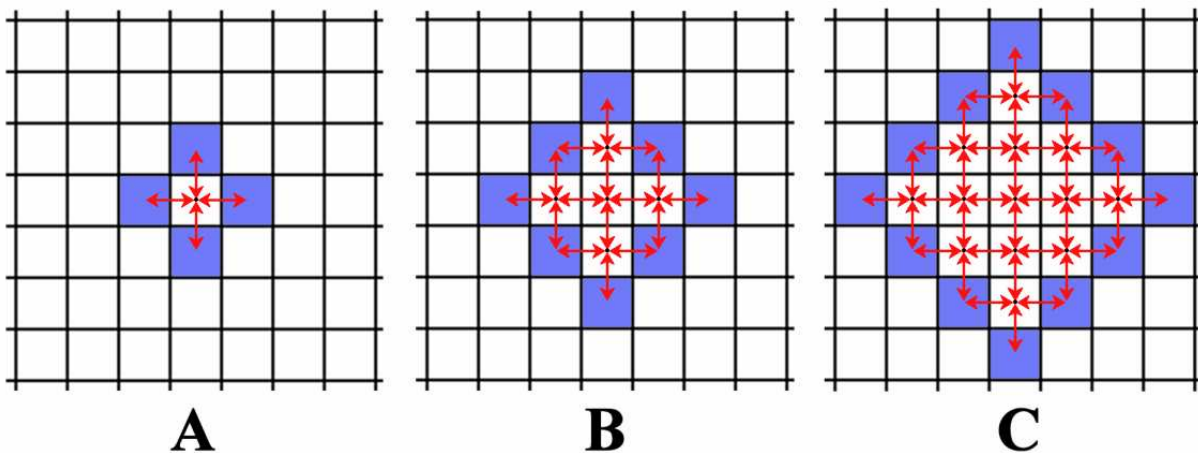


Figure 36. La numérisation de l'équation de la diffusion produit des fronts d'ondes carrés. Ce schéma illustre la façon dont apparaissent les fronts d'ondes carrés sur une grille carrée discrète. En (A), la matière diffuse depuis le point central vers ses voisins du 1^{er} ordre. À l'instant d'après (B), puis (C), la diffusion continue à partir des voisins vers leurs propres voisins. Le front de diffusion est marqué en bleu sur la grille. On voit nettement que celui-ci est carré.

Dans un modèle visant à générer des formes auto-organisées, cela peut avoir des conséquences fâcheuses. Le biais que constitue la génération de fronts d'ondes carrés peut

induire un biais lors de la formation des motifs auto-organisés. Dans notre modèle, ce problème est aggravé par le fait que les microtubules recherchent les zones de forte concentration en tubuline. Un microtubule en croissance crée localement une déplétion en tubuline. Par diffusion, cette déplétion est peu à peu comblée par la tubuline environnante. L'effet de déplétion, tout en s'amenuisant localement, se propage autour du point d'origine. Cependant, si la méthode est imparfaite et génère des fronts d'ondes carrés, alors la déplétion se transmettra moins vite sur les diagonales de ce point. Autour de l'extrémité d'un microtubule, les zones les plus concentrées en tubuline seront donc sur les diagonales. Le microtubule, suivant son algorithme bien déterministe, va alors dévier de sa trajectoire pour prendre peu à peu une direction diagonale. Cet effet, bien que très faible, privilégie peu à peu un seul type d'orientation pour tous les microtubules, les directions diagonales.

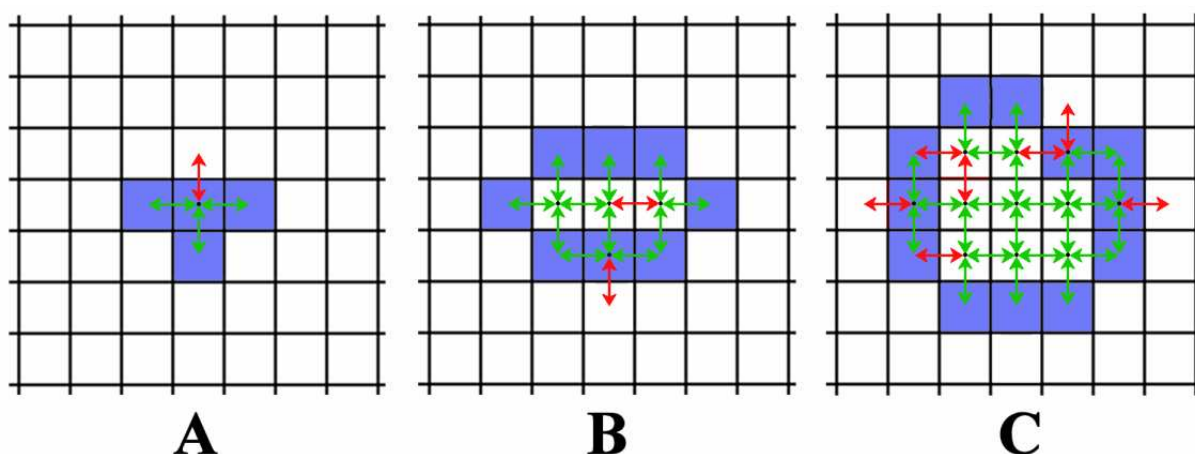


Figure 37. La méthode des 'ponts cassés'. Ce schéma illustre la façon dont on peut empêcher l'apparition de fronts d'ondes carrés en empêchant à la diffusion de se faire sur des points choisis au hasard. Comme dans la figure 36, on schématise la diffusion discrète à trois instants successifs (A, B, C). Les flèches vertes indiquent les zones (ponts) où se font la diffusion et les flèches rouges, là où elle a été empêchée. Les ponts cassés (flèches rouges) sont choisis à chaque instant au hasard. Le front de diffusion est toujours marqué en bleu. On voit que le fait d'introduire un bruit dans la diffusion génère un front d'onde totalement différent de celui qui est montré figure 36. Celui-ci a un aspect beaucoup moins régulier et surtout il n'est pas carré et change sans arrêt. Cette méthode, utilisée à bon escient (bruit faible) est un excellent moyen d'empêcher le phénomène de fronts d'ondes carrés

Pour résoudre ce problème, il existe une solution. Il s'agit de la méthode des ponts cassés [Elmoznino 1999]. Cette méthode consiste à introduire un léger bruit dans la diffusion. Considérons une cellule et ses 4 voisines. Lors de la diffusion, il y a un transport de matière

entre la cellule centrale et les 4 cellules voisines. On peut imaginer cette relation par des ponts disposés entre la cellule centrale et chacune de ses voisines. Dans le calcul habituel de la diffusion, la quantité de matière transportée est égale sur chacun de ces ponts. Dans la méthode des ponts cassés, on admet qu'il existe une certaine possibilité pour qu'un des ponts choisi au hasard ne fonctionne plus durant le laps de temps dt : on casse un pont au hasard. Dans ce cas, l'échange de matière ne se fait plus qu'entre la cellule centrale et les 3 cellules voisines restantes. Cela se passe exactement comme si on rajoutait des obstacles transitoires au hasard dans l'environnement pour perturber la diffusion. La correction du front d'onde réside dans le fait que ces obstacles apparaissent aléatoirement dans l'environnement et de façon différente à chaque fois (Figure 37).

La technique que nous avons développée est proche de celle des ponts cassés, à ceci près qu'elle est moins brutale puisque cette fois on ne casse pas complètement les ponts. On ne fait que réduire légèrement le trafic d'un pont en augmentant d'autant celui du pont opposé. Dans une direction, par exemple sur l'axe horizontal, si on diminue l'intensité de la diffusion de quelque pour cents sur la droite, on l'augmente de la quantité équivalente sur la gauche. Dans la pratique, considérons que B est le niveau maximal de bruit compris entre 0 et 1. Pour la diffusion de chaque point on tire aléatoirement deux nombres compris entre $-B$ et B , un nombre pour l'axe vertical (B_V), l'autre pour l'axe horizontal (B_H). Ensuite, on ajuste les coefficients de diffusion sur chaque axe par ces quantités. Dans le cas d'une diffusion isotrope, l'équation de diffusion devient,

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} \left((1 + B_H) \cdot C_{i+1,j} + (1 - B_H) \cdot C_{i-1,j} + (1 + B_V) \cdot C_{i,j+1} + (1 - B_V) \cdot C_{i,j-1} - 4 \cdot C_{i,j} \right)$$

(4)

Plus on augmente le bruitage, plus on fait disparaître les fronts d'ondes carrés, mais on bruite d'autant plus un système censé être déterministe, c'est-à-dire dans lequel le hasard n'a pas sa place. On peut s'interroger sur le bien-fondé d'ajouter du hasard dans un système déterministe qui est censé s'auto-organiser spatialement : l'ajout de bruit ne va-t'il pas perturber l'auto-organisation ? Rappelons que dans la réalité, les microtubules ne s'auto-organisent que s'ils sont soumis à l'action d'un champ ou d'une perturbation externe introduisant un biais directionnel global dans la solution. Sans ceci, le système ne s'auto-organise pas. Nous avons donc pu déterminer des niveaux de bruit éliminant suffisamment les fronts d'ondes carrés pour empêcher l'auto-organisation sans perturbation directionnelle externe, mais pas trop forts non plus pour ne pas altérer l'auto-organisation quand on applique

un biais directionnel global. Le niveau de bruit adéquat est de 5% seulement, soit $B=0.05$, c'est-à-dire une valeur comprise entre 0.95 et 1.05 pour le facteur correctif de la diffusion.

2.4. Simuler la gravité ou briser l'isotropie spatiale du processus de réaction-diffusion ?

Nous avons maintenant vu comment sont représentés dans le modèle les protagonistes du processus de réaction-diffusion. Chaque microtubule est un objet articulé composé d'un certain nombre d'éléments de $1 \mu\text{m}$ de long et dont on connaît toutes les positions dans l'espace. Dans une simulation habituelle, il y a entre 10^4 et 10^6 de ces objets articulés. Les molécules de tubuline, elles, ne sont pas explicitement représentées. On ne retient que leurs concentrations locales, stockées dans deux tableaux à deux dimensions (un pour la tubuline-GTP et un pour la tubuline-GDP), dont chaque case représente la concentration sur un espace carré de $1 \mu\text{m}$ de côté.

Si l'on s'en réfère à Kondepudi et Prigogine [Kondepudi and Prigogine 1981, Kondepudi 1982], la gravité agit dans les systèmes de réaction-diffusion en interagissant avec de fortes fluctuations de densité qui se forment à un moment critique, à une phase précoce du processus d'auto-organisation. Nous le verrons plus tard, dans les résultats des simulations, des fluctuations de densité importantes se forment dans les solutions de microtubules simulées. L'essentiel des écarts de densité est dû à des écarts de concentration en microtubules. Dans les simulations, des îlots concentrés en microtubules apparaissent donc au moment d'instabilité (overshoot). La gravité agirait donc en induisant une dérive directionnelle de ces îlots concentrés de microtubules.

En modélisation, dans l'état actuel des moyens techniques (puissance de calcul), il aurait été vraiment beaucoup trop lourd de calculer, à chaque pas de temps, l'interaction de la gravité avec chacune de ces formations en îlots, contenant tous ces objets articulés que sont les microtubules. Il faudrait en effet calculer, à chaque pas de temps, le déplacement de chacun des éléments, de chaque microtubule, de toute la population simulée, avec comme contrainte le fait que la taille de ces objets articulés ne soit pas modifiée.

Une solution beaucoup plus simple est de faire l'inverse, c'est-à-dire de déplacer le motif de concentration en tubuline (les deux tableaux de tubuline) par rapport à la position des microtubules. Ce n'est bien évidemment pas la même chose que de calculer explicitement l'action de la gravité, mais cela produit une rupture de symétrie qui s'en approche. Concrètement, en plus de la diffusion, on rajoute dans l'équation un terme de flux directionnel

vers le bas. La quantité de matière est progressivement décalée de haut en bas. Un terme de flux est donc ajouté à l'équation de la diffusion, comme suit.

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{i+1,j} + C_{i-1,j} - 2 \cdot C_{i,j}) + \frac{D_{Tubuline}}{dy^2} (C_{i,j+1} + C_{i,j-1} - 2 \cdot C_{i,j}) + \frac{\beta}{dy} (C_{i,j-1} - C_{i,j}) \quad (5)$$

avec β , le coefficient du flux directionnel.

Une autre façon de faire encore plus simple consiste simplement à briser l'isotropie de la diffusion. Bien entendu, cette méthode ne simule pas du tout l'action de la gravité, et ce n'est d'ailleurs pas le but, mais cela suffit pour rompre la symétrie du processus de réaction-diffusion. Pour cela, on fait en sorte que la diffusion moléculaire soit plus importante selon l'axe vertical que selon l'axe horizontal, simplement en appliquant des vitesses de diffusion différentes selon les deux axes. Il suffit de découpler l'équation de la diffusion en deux termes, différenciant la diffusion sur l'axe vertical de celle sur l'axe horizontal. L'équation prend ainsi la forme suivante :

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{x,Tubuline}}{dx^2} (C_{i+1,j} + C_{i-1,j} - 2 \cdot C_{i,j}) + \frac{D_{y,Tubuline}}{dy^2} (C_{i,j+1} + C_{i,j-1} - 2 \cdot C_{i,j}) \quad (6)$$

, avec $D_{x,Tubuline}$ la constante de diffusion de la tubuline dans la direction horizontale, et $D_{y,Tubuline}$ dans la direction verticale. Le maillage du domaine de réaction étant carré, le pas du maillage est de valeur égale dans les deux directions de l'espace, soit $dx = dy = 1 \mu m$. Dans un modèle de diffusion bruitée (cf. Section précédente), cette équation devient,

$$\begin{aligned} \frac{dC_{i,j}}{dt} = & \frac{D_{x,Tubuline}}{dx^2} \left((1 + B_H) \cdot C_{i+1,j} + (1 - B_H) \cdot C_{i-1,j} - 2 \cdot C_{i,j} \right) \\ & + \frac{D_{y,Tubuline}}{dx^2} \left((1 + B_V) \cdot C_{i,j+1} + (1 - B_V) \cdot C_{i,j-1} - 2 \cdot C_{i,j} \right) \end{aligned} \quad (7)$$

Dans les simulations, nous avons essayé des brisures d'isotropie de plus en plus importantes. L'importance de la brisure dépend du coefficient multiplicateur entre les constantes de diffusion des deux axes, c'est-à-dire $\alpha = D_{y,Tubuline} / D_{x,Tubuline}$. On peut ainsi écrire cette équation de la diffusion comme suit.

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{i+1,j} + C_{i-1,j} - 2 \cdot C_{i,j}) + \alpha \cdot \frac{D_{Tubuline}}{dx^2} (C_{i,j+1} + C_{i,j-1} - 2 \cdot C_{i,j}) \quad (8)$$

Les deux méthodes précédentes ont été utilisées. Bien que leur effet soit différent, ces deux méthodes permettent de briser la symétrie du processus de réaction-diffusion. En conséquence, les résultats de simulations ne sont pas différentiables. Nous verrons dans le chapitre suivant que n'importe quel petit facteur permettant de briser la symétrie du processus

(biais numérique, champs magnétiques simulés, diffusion différentielle), suffit à déclencher l'auto-organisation des échantillons sous forme de morphologies striées.

Pour une raison pratique, c'est la dernière méthode qui a été utilisée dans nos simulations. La brisure de l'isotropie de l'espace qu'elle produit, introduit l'asymétrie nécessaire à l'apparition d'une forme macroscopique auto-organisée.

2.5. La communication entre les microtubules

Les microtubules s'auto-organisent parce qu'ils communiquent entre eux par l'intermédiaire des molécules de tubuline libres dans la solution. La communication chimique entre les microtubules peut agir de deux façons différentes : elle peut se faire selon un processus de type chimiotactique, mais également par un mécanisme de sélection. Ces deux mécanismes ne fonctionnent pas du tout de la même manière, mais ils sont très probablement coexistants et complémentaires.

Reprenons cet exemple qui nous est si cher, celui des fourmis, car on peut y observer les mêmes processus de communication que ceux que nous allons décrire. Nous avons déjà décrit le comportement social de ces insectes et nous avons vu qu'ils communiquent entre eux par des traînées de substances chimiques, les phéromones, qu'ils laissent sur leur passage. Une fourmi dévie de sa trajectoire initiale lorsqu'elle passe sur la trajectoire d'une autre fourmi qui a laissé derrière elle une traînée de phéromones. C'est un processus s'apparentant au chimiotactisme. Un autre moyen d'organiser les individus d'une société est un processus de sélection qui élimine les individus qui ne se dirigent pas vers des endroits favorables à leur croissance et inversement permet la survie des individus qui se trouvent dans des zones favorables. Lorsqu'une fourmi se dirige vers une source de nourriture empoisonnée, elle meurt et ne revient pas à la fourmilière. Cette source empoisonnée n'est donc pas signalée et cette zone reste ignorée par l'ensemble de la colonie. En revanche, les fourmis qui se dirigent vers des sources de nourriture comestible survivent et le chemin qui mène vers cette nourriture se renforce.

2.5.1. Organisation par un processus de sélection

On considère souvent que les microtubules sont des structures extrêmement rigides [Gittes et al 1993, Venier et al 1994]. Dans ce cas, les microtubules ne peuvent pas dévier d'une trajectoire linéaire pour aller rechercher les zones de forte concentration en tubuline

active. Cependant, l'obtention de motifs de concentration et d'orientation des microtubules peut potentiellement se faire par une sélection progressive des microtubules correctement orientés et par l'élimination des microtubules mal orientés. Ce mécanisme repose sur la réponse brutale que peuvent avoir les microtubules en fonction des concentrations rencontrées en tubuline-GTP et en tubuline-GDP, c'est-à-dire sur leur instabilité dynamique. Un microtubule qui arrive dans une zone de faible concentration en tubuline active devient instable et se désassemble; il est éliminé. En revanche, s'il arrive dans une zone favorable, riche en tubuline-GTP, il est maintenu. Progressivement, microtubule après microtubule, un motif de concentration et d'orientation, obtenu par sélection des microtubules 'correctement disposés', apparaît. Certains modèles reposent sur ce principe, mais à partir de microtubules pré-orientés à l'aide de molécules auxiliaires, comme par exemple les MAP [Holy and Leibler 1994]. Des simulations ont été faites en rendant les microtubules rigides, c'est-à-dire incapables de se courber. Aucune auto-organisation n'a pu être obtenue. Cependant ce mécanisme n'est pas à rejeter pour autant. Dans des simulations normales dans lesquelles des stries composées de microtubules se forment, on observe que ce mécanisme sert à renforcer la formation des stries en éliminant les microtubules qui commencent à se développer en dehors des stries et sert à synchroniser les microtubules entre eux dans une même strie.

2.5.2. organisation par un processus chimiotactique

En plus du processus de sélection, il est imaginable que les microtubules s'organisent entre eux par un processus de type chimiotactique. Ceci constitue une des caractéristiques majeures de notre modèle. Un microtubule qui se forme a tendance à se diriger vers les zones de forte concentration en tubuline active et à éviter les zones chimiquement défavorables en déviant de sa trajectoire initiale.

On considère cette fois des microtubules relativement souples. Au vu de plusieurs travaux portant sur la structure et la robustesse des microtubules, cette hypothèse serait rapidement rejetée. Il est en effet souvent mentionné que les microtubules sont des structures extrêmement rigides avec un rayon de persistance très élevé, de l'ordre de 5 μm [Gittes et al 1993, Venier et al 1994]. Notre hypothèse est cependant loin d'être déraisonnable. D'autres travaux montrent en effet que les microtubules sont capables de se déformer de façon importante sous l'action de la force qu'ils génèrent eux même par poussée entre les deux parois [Dogterom and Yurke 1997]. Certes, la déformation est due à une force mécanique, et non à une déviation de type recherche chimiotactique. D'autres travaux indiquent que des

défauts peuvent fréquemment apparaître lors de la croissance d'un microtubule [Chretien and Wade 1991] et pourraient permettre leur déviation, même si rien n'indique que celle-ci est liée à la présence de gradients de tubuline. L'idée de recherche de type chimiotactique par les microtubules a par ailleurs déjà été utilisée dans un autre modèle du même type que le nôtre [Robert et al 1990]. Précisons que, dans notre modèle, les microtubules ne sont pas libres de dévier au gré des gradients de concentration. Ils ont une certaine rigidité, implicite dans le modèle, se traduisant par une recherche des meilleurs gradients, mais dans un angle restreint à une dizaine de degrés par micromètre ($12^\circ \cdot \mu\text{m}^{-1}$ habituellement soit $4.8 \mu\text{m}$ de rayon de courbure). Cette valeur est bien inférieure à la courbure observée sur des photos de microtubules prises en microscopie électronique ; les valeurs mesurées sont des variations de trajectoire de l'ordre de $50^\circ \cdot \mu\text{m}^{-1}$ équivalent à un rayon de courbure d'environ $1 \mu\text{m}$, et pouvant aller jusqu'à $200^\circ \cdot \mu\text{m}^{-1}$, soit un rayon de courbure d'environ $0.3 \mu\text{m}$. En microscopie optique on peut aussi observer de fortes courbures des microtubules et des faisceaux de microtubules vus en fluorescence (Figure 38 B). Nous pensons donc qu'il est tout à fait probable que les microtubules se courbent lors de leur croissance.

2.5.3. Recherche des gradients de tubuline dans le modèle

Chacun des éléments constituant un microtubule est disposé selon un angle nommé α donnant l'orientation de cet élément par rapport à l'horizontale dans l'environnement. Lorsqu'un microtubule croît, à chaque fois qu'un nouvel élément est ajouté à son extrémité, il faut déterminer l'orientation dans l'environnement de ce nouvel élément, c'est-à-dire son angle α . Pour cela, on recherche, au voisinage de l'extrémité, la direction vers laquelle se situe l'environnement réactif le plus favorable, c'est-à-dire la zone la plus riche en tubuline-GTP et contenant le moins de tubuline-GDP. On détermine ainsi le chemin le plus favorable à la croissance du microtubule.

En dimension 2, le programme effectue une recherche autour de l'axe déterminé par l'angle α du microtubule à l'instant précédent, avec un certain angle de battement φ , et sur une certaine distance 'd' qui correspond à la sensibilité de la recherche. L'angle de battement φ correspond en fait à la courbure maximale que peut prendre un microtubule de part et d'autre de son axe initial. Ainsi, l'angle de battement de 12° utilisé dans nos simulations, correspond à une déviation de $12^\circ \cdot \mu\text{m}^{-1}$, soit un rayon de courbure de $4.8 \mu\text{m}$. La sensibilité 'd' correspond à la distance sur laquelle on va prévoir le chemin d'un microtubule à un instant donné. La sensibilité utilisée dans les simulations est de $8 \mu\text{m}$.

En ce qui concerne le calcul, concrètement, pour chaque angle α' compris entre $\alpha-\varphi$ et $\alpha+\varphi$, on calcule la somme des concentrations en tubuline contenues dans les cellules du tableau des concentrations en tubuline active, le long du segment de droite de longueur 'd' et partant de l'extrémité du microtubule avec un angle α' par rapport à l'horizontale. Le chemin (l'angle α') qui possède le plus grand poids, c'est-à-dire celui qui est le plus favorable à la croissance du microtubule, est retenu. Quand plusieurs chemins atteignent le poids maximal, c'est celui qui est le plus proche de la direction initiale du microtubule (angle α) qui est choisi. La figure 38A illustre cet algorithme.

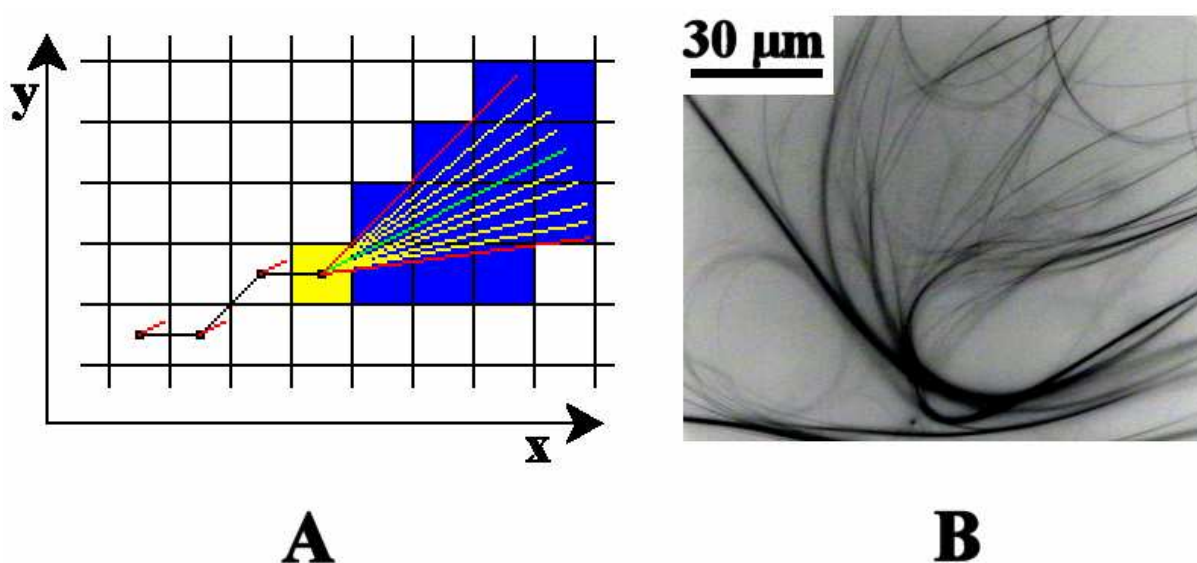


Figure 38. *Méthode discrète de recherche des zones favorables pour un microtubule en croissance (A). Le microtubule est en noir et son extrémité croissante est dans la case marquée en jaune représentant l'environnement en tubuline à cette extrémité. Dans l'algorithme, des lignes d'une certaine longueur sont projetées depuis cette extrémité et la quantité de tubuline active le long de ces lignes (zone bleue) est calculée. Ce calcul est fait dans l'axe de croissance de l'extrémité, selon un angle mort compris entre les lignes rouges. Le microtubule croît alors dans la direction indiquée par la ligne correspondant au gradient de tubuline active le plus fort. La photographie (B), prise en fluorescence DAPI (image négative pour plus de contraste) montre des microtubules regroupés et fortement courbés.*

L'inconvénient de ce mécanisme, c'est que l'on est obligé de jongler entre une sensibilité élevée et un angle de battement faible ou bien une sensibilité faible mais un angle de battement élevé. Ceci est un des problèmes liés à la discrétisation de l'espace en cellules de $1\mu\text{m}$ de coté. En effet, si on prend un angle de battement faible, par exemple 10° , et une

sensibilité faible, de 1 à 6 μm par exemple, on ne pourra explorer que les cellules du tableau des concentrations qui sont dans l'axe de l'angle α , mais pas les cellules voisines. On est donc obligé d'augmenter, soit l'angle de battement, soit la sensibilité. Une autre solution est encore d'affiner le maillage des grilles de concentration, mais nous avons déjà vu que cela est très coûteux en temps de calcul.

Augmenter la sensibilité 'd' n'est pas vraiment gênant, car l'idée que les microtubules suivent la meilleure trace de tubuline active, même si cette trace est déterminée sur une grande distance, est tout à fait raisonnable. Ce n'est cependant pas une méthode précise, car, dans ce cas, une telle recherche peut déterminer un chemin aboutissant dans des zones de forte concentration qui sont éloignées, mais obligeant le microtubule à traverser des zones pauvres en tubuline active. D'un autre côté, augmenter l'angle de battement est plus précis, car cela n'oblige pas à rechercher dans la grille sur de grandes distances, mais c'est aussi moins réaliste, car les microtubules dans la réalité sont quand même assez rigides. Enfin, il ne faut pas négliger le fait que ces calculs sont d'autant plus coûteux que la sensibilité ou l'angle de battement sont élevés.

Attention cependant le chimiotactisme n'est qu'une façon de modéliser simplement un processus dont le résultat est équivalent. En réalité, au même titre qu'une bactérie ne remonte pas les gradients de chémo-attractants par recherche des plus forts gradients, mais par marche aléatoire biaisée, un microtubule ne peut pas chercher un gradient. Ce n'est que sa probabilité de formation et de croissance qui est plus élevée quand les concentrations de tubuline active augmentent. Ni les bactéries, ni les microtubules ne 'voient' à distance pour pouvoir évaluer la force des gradients de produits qui les entourent. Cependant, dans le cas idéal, c'est-à-dire dans une marche aléatoire fortement biaisée, on peut ramener le problème à une recherche des plus forts gradients de tubuline active, comme l'ont fait C. Robert & al dans leur modèle.

Notre modèle intègre à la fois une recherche de type chimiotactique, mais aussi les avantages que procure la dynamique microtubulaire. La coexistence et la complémentarité des deux mécanismes renforcent le processus d'orientation durant l'auto-organisation des microtubules.

3. Cinétiques réactionnelles

Du fait de la polarité structurelle des microtubules, les équations cinétiques diffèrent entre les deux extrémités d'un microtubule. Les deux extrémités peuvent s'assembler ou se

désassembler mais dans les mêmes conditions elles ne se comportent pas de la même façon. L'extrémité positive est plus réactive mais la concentration critique en tubuline pour laquelle l'extrémité négative change brutalement de comportement, est supérieure à celle de l'extrémité positive. Cela signifie que lorsque les extrémités se trouvent dans des conditions de concentration en tubuline comprises entre ces deux concentrations critiques, l'extrémité positive s'assemble tandis que l'extrémité négative se désassemble, c'est-à-dire que le microtubule est en phase de 'treadmilling'. De plus, le comportement réactif des extrémités d'un microtubule est extrêmement non linéaire en fonction de l'état de l'extrémité elle-même et des concentrations environnantes en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. En conséquence, lorsqu'une extrémité se trouve dans un état critique, son comportement (assemblage ou désassemblage) peut changer brutalement faisant passer le microtubule d'un état de 'treadmilling' à un état 'd'instabilité dynamique'. Cela peut survenir soit parce que la couche protectrice de tubuline-GTP qui se trouve à son extrémité (cape) est dans un état critique voire même inexistante, soit parce que les concentrations en tubuline qu'elle rencontre sont défavorables à sa stabilité. Les microtubules étant des structures de grande taille, leurs deux extrémités ne sont pas nécessairement dans les mêmes conditions réactives. Une extrémité peut être dans des conditions tout à fait favorable à sa croissance tandis que l'autre se trouve dans une région très pauvre en tubuline-GTP, donc peu favorable à sa croissance. Les deux extrémités sont donc indépendantes du point de vue de leur réactivité.

Pour rendre compte de l'ensemble des points évoqués ci-dessus, nous avons dû élaborer un nouveau modèle cinétique, différent de ceux que l'on trouve dans la littérature. Chacun des aspects de ce modèle cinétique est détaillé dans cette section et s'appuie sur les données et connaissances générales que nous avons pu extraire de la littérature et de nos expériences. Le modèle cinétique étant présenté ci-dessous sous une forme plutôt disséquée, nous mettons à la disposition du lecteur, le jeu complet des équations cinétiques incorporées dans le programme, dans un appendice (cf. Annexe 6).

3.1. Croissance d'un microtubule

Le comportement général d'un microtubule, ou plus précisément d'une extrémité, est non linéaire vis-à-vis des concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. La tubuline-GTP favorise la croissance du microtubule au niveau de l'extrémité concernée alors que la tubuline-GDP produit l'effet inverse. Pour une concentration donnée de tubuline-GTP, la tubuline-GDP agit en diminuant la proportion de tubuline-GTP utilisable. La concentration de

tubuline-GTP, $TGTP_{eff}$, est proportionnelle au ratio, f_{TGTP} , de tubuline-GTP par rapport à la quantité totale de tubuline libre (tubuline-GTP et tubuline-GDP).

$$[TGTP_{eff}] = f_{TGTP} \cdot [TGTP] \quad (9)$$

$$f_{TGTP} = \frac{[TGTP]}{[TGTP] + [TGDP]} \quad (10)$$

Comme cela a été expliqué précédemment, les expériences montrent une forte dépendance non linéaire de la croissance microtubulaire vis-à-vis de la concentration en tubuline-GTP. Pour obtenir ce type de dépendance, la loi de croissance est exprimée comme une fonction de Hill, F donnée ci-dessous.

$$F([TGTP_{eff}], n_{Growth}, \lambda_{Growth}) = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{[TGTP_{eff}]}{\lambda_{Growth}} \right)^{n_{Growth}}} \quad (11)$$

L'équation de Hill décrit une fonction sigmoïde en forme de marche d'escalier. Le paramètre λ_{Growth} correspond au point d'inflexion de la fonction. Le paramètre n_{Growth} est la puissance de la fonction de Hill et permet de modifier la courbe de la courbe au niveau du point d'inflexion λ_{Growth} . Quand n_{Growth} est grand, la fonction a un aspect de marche d'escalier carrée, quand il est faible, la transition entre les valeurs maximales et les valeurs minimales de la courbe est beaucoup plus douce. La valeur maximale que peut atteindre cette fonction est égale à 1 et la valeur minimale est égale à 0. Utiliser ce type de fonction permet d'obtenir de grandes variations de la vitesse de croissance pour de faibles changements dans la concentration en tubuline active. Comme cela a été décrit précédemment, les paramètres λ_{Growth} et n_{Growth} de l'équation (5) ont été choisis pour obtenir un comportement proche de celui qui est observé expérimentalement.

Actuellement, le mécanisme exact de la croissance microtubulaire est encore mal connu. Dans les simulations, la fonction de Hill a été employée pour décrire de façon empirique l'assemblage des microtubules tel qu'il est observé.

La vitesse de croissance du microtubule à une extrémité (6), V_{Growth} , fonction de la quantité locale de tubuline active, $TGTP_{eff}$, est obtenue par le produit de la fonction sigmoïde (5) avec la vitesse de croissance maximale dont est capable un microtubule, $V_{\max_{Growth}}$, donnant ainsi une cinétique de type coopérative.

$$V_{Growth} = V_{\max_{Growth}} \cdot F([TGTP_{eff}], n_{Growth}, \lambda_{Growth}) \quad (12)$$

Pour l'extrémité 'positive' des microtubules nous avons fixé les paramètres de leur croissance de la façon suivante. Conformément aux diverses observations expérimentales, la vitesse maximale de croissance $V_{\max_{Growth}}^+$ a été fixée à $20 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$. Le point d'inflexion λ_{Growth}^+ correspond à la concentration de tubuline à partir de laquelle la croissance d'un microtubule explose. Pour être en accord avec ce qui est observé expérimentalement, cette concentration critique a été fixée à $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de tubuline. De la même façon, le paramètre n_{Growth}^+ a été fixé à 40. Ceci permet d'obtenir une vitesse d'assemblage proche de la vitesse maximale possible pour une concentration de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, et un arrêt brutal de la croissance en deçà de cette valeur.

Pour la croissance de l'extrémité 'négative', les valeurs des paramètres, $V_{\max_{Growth}}^-$, λ_{Growth}^- , n_{Growth}^- , sont différentes. D'après les observations expérimentales, la vitesse maximale de croissance est plus faible au niveau de l'extrémité négative qu'au niveau de l'extrémité positive. Nous l'avons fixée à $5 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$. Le point d'inflexion λ_{Growth}^- est plus élevé que λ_{Growth}^+ et prend pour valeur $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Le paramètre n_{Growth}^- est quant à lui égal à 8. Cette valeur est bien inférieure à celle de l'extrémité positive ($n_{Growth}^+ = 40$). C'est une façon de décrire le fait que l'extrémité négative des microtubules est moins réactive que l'extrémité positive.

Dans tous les cas, la tubuline-GTP ajoutée à l'extrémité croissante du microtubule est retirée de la concentration en tubuline-GTP libre présente à cette extrémité. La concentration en tubuline-GTP, $[TGTP]$, devient en ce point, durant le laps de temps Δt :

$$[TGTP]^{t+\Delta t} = [TGTP]^t - \Delta t \cdot V_{Growth} \quad (13)$$

3.2. Décroissance d'un microtubule

Quand un microtubule se met à se désassembler, de la tubuline-GDP est libérée. Cela accroît la concentration de tubuline-GDP libre au niveau de l'extrémité décroissante. L'évolution de la concentration en tubuline-GDP en ce point est exprimée comme suit :

$$[TGDP]^{t+\Delta t} = [TGDP]^t + \Delta t \cdot V_{Shrink} \quad (14)$$

Le désassemblage à l'une ou l'autre des extrémités (positive ou négative), est décrit par le même type d'expression que pour l'assemblage du microtubule.

$$V_{Shrink} = V_{\max_{Shrink}} \cdot (1 - G([MT_{TGTP}], n_{Shrink}, \lambda_{Shrink})) \quad (15)$$

$$\text{avec } G([MT_{TGTP}], n_{Shrink}, \lambda_{Shrink}) = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{[MT_{TGTP}]}{\lambda_{Shrink}} \right)^{n_{Shrink}}} \quad (16)$$

Cette expression de la vitesse de désassemblage, V_{Shrink} , contient aussi une fonction de Hill nommée G. Cependant, cette expression du désassemblage diffère de celle de l'assemblage sur plusieurs points. Premièrement, pour produire le comportement à l'opposé de la croissance, la fonction de Hill est soustraite de l'unité. Deuxièmement, les facteurs qui gouvernent la vitesse de désassemblage ne sont pas les mêmes que ceux qui contrôlent l'addition de la tubuline, et comme cela a été décrit précédemment, ils sont mieux connus. Pour le raccourcissement d'un microtubule, le facteur critique c'est la composition de l'extrémité concernée, soit en tubuline-GTP soit en tubuline-GDP. Nous l'avons vu, les études sur les microtubules ont montré l'existence de ce que l'on appelle des 'capes'. Ces portions de tubuline assemblée situées à l'extrémité des microtubules sont constituées de tubuline-GTP. C'est de leur présence que dépend le désassemblage des extrémités.

Quand cette portion de tubuline-GTP est absente de l'extrémité, le désassemblage est rapide. Cela donne une vitesse de désassemblage maximale de l'ordre de $100 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$. Quand de la tubuline-GTP est présente au niveau de l'extrémité, le désassemblage est très lent.

Cette portion de tubuline-GTP, lorsqu'elle est présente, est constamment convertie en tubuline-GDP par hydrolyse du GTP en GDP, à une vitesse constante V_{conv} . Cette vitesse est

plus lente que la vitesse à laquelle s'ajoutent les molécules de tubuline-GTP au bout de l'extrémité croissante d'un microtubule. Cela permet une accumulation progressive d'une petite quantité de tubuline-GTP dans l'extrémité du microtubule. C'est ainsi que les 'capes' se forment. Nous avons fixé la valeur de la vitesse de conversion à $3 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les extrémités positives et les extrémités négatives.

La longueur (MT_{TGP}) de la portion de tubuline-GTP au niveau d'une extrémité commence à décroître quand la vitesse de croissance chute en dessous de la vitesse de conversion V_{conv} . La variation de longueur de cette portion de tubuline-GTP est donnée par l'expression suivante

$$\frac{d[MT_{TGP}]}{dt} = V_{\max_{Growth}} \cdot F([TGTP]_{eff}, n_{Growth}, \lambda_{Growth}) - V_{\max_{Shrink}} \cdot (1 - G([MT_{TGP}], n_{Shrink}, \lambda_{Shrink})) - V_{conv} \quad (17)$$

Cette relation intègre les vitesses de croissance et de décroissance de l'extrémité du microtubule et la vitesse de conversion de la tubuline-GTP en tubuline-GDP. La longueur de la 'cape', MT_{TGP} , est elle-même incorporée dans l'expression de la vitesse de décroissance.

Pour l'extrémité positive des microtubules, nous avons fixé les paramètres de la réaction de désassemblage comme suit. La littérature rapporte des valeurs souvent très différentes pour la vitesse que peut atteindre le désassemblage d'un microtubule à son extrémité positive. Cette valeur est de l'ordre de la centaine de micromètres par minute. Nous avons donc fixé la vitesse maximale de décroissance, $V_{\max_{Shrink}}^+$, à $100 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Le point d'inflexion λ_{Shrink}^+ de la fonction de Hill G est équivalent à la longueur de la portion de tubuline-GTP, MT_{TGP}^+ , à laquelle le désassemblage du microtubule devient rapide. Il est souvent admis qu'une courte partie ne contenant que quelques molécules de tubuline-GTP à l'extrémité du microtubule suffit à protéger le microtubule contre un désassemblage rapide. Nous avons arbitrairement fixé ce nombre à 6 dimères de tubuline-GTP. Le comportement général de la solution de microtubule est assez peu sensible à sa valeur exacte. Pour des raisons facilitant les calculs, λ_{Shrink}^+ n'est pas exprimé comme une taille en micromètres, ni même comme un nombre de molécules de tubuline-GTP. Ce nombre de molécules de tubuline-GTP a en fait été converti en concentration : c'est la concentration représentée par 6 dimères de tubuline-GTP pris dans une cellule de l'espace réactionnel, c'est-à-dire dans un volume de $1 \mu\text{m}^3$. Cette valeur est de $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Le paramètre n_{Shrink}^+ a été fixé à 40,

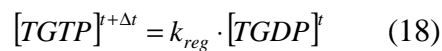
ceci donnant à la fonction de Hill un aspect abrupt ce qui concorde avec le changement brutal de comportement, d'un désassemblage lent à un désassemblage extrêmement rapide, lors d'une très faible variation de la quantité de tubuline-GTP, MT_{TGP}^+ , intégrée dans l'extrémité du microtubule.

Pour le désassemblage des extrémités négatives, les valeurs des paramètres $V_{\max \text{ Shrink}}^-$, $\lambda_{\text{Shrink}}^-$, n_{Shrink}^- , sont différentes. En ce qui concerne la vitesse maximale de désassemblage des extrémités négatives, il semble que cette valeur soit inférieure à celle des extrémités positives. Nous avons fixé cette valeur à $25 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Le point d'inflexion $\lambda_{\text{Shrink}}^-$ a la même valeur, $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, et n_{Shrink}^- a pour valeur 20 ce qui est inférieur à l'extrémité positive ($n_{\text{Shrink}}^+ = 40$) pour signifier une réactivité moins élevée.

3.3. Régénération de la tubuline

Un élément important couvrant l'ensemble du processus réactif et sans lequel l'auto-organisation des microtubules ne pourrait se faire, est la régénération de la tubuline-GTP à partir de la tubuline-GDP rejetée depuis les extrémités décroissantes des microtubules. Si la tubuline-GDP n'était pas ainsi 'recyclée', non seulement la réaction tomberait vite à cours de réactifs utilisables, mais plus simplement les traînées concentrées de tubuline-GTP ne pourraient se former. La combinaison de ce facteur avec la diffusion de la tubuline forme la base réactive de la façon dont les microtubules individuels communiquent entre eux et se comportent comme un ensemble collectif.

La réaction de régénération de la tubuline est exprimée comme suit :



Les valeurs expérimentales de la vitesse de régénération k_{reg} sont comprises entre 0.02 s^{-1} to 0.2 s^{-1} [Melki et al 1988]. Lorsqu'on se place en excès de GTP, on peut considérer que cette vitesse est constante et a pour valeur 0.2 s^{-1} . Lorsque la concentration de GTP est faible, la vitesse de régénération est plus lente. Comme cela a été observé expérimentalement, nous avons montré dans les simulations que le fait de faire passer la valeur de k_{reg} entre ces deux extrêmes permet d'observer deux types de comportements différents, à savoir l'auto-organisation de la solution de microtubules pour une valeur de 0.2 s^{-1} et des oscillations de concentration de la solution pour une valeur de 0.02 s^{-1} .

3.4. Destruction et nucléation des microtubules

Dans notre modèle, en plus de la possibilité de changer leur taille, les microtubules peuvent être détruits totalement par désassemblage et de nouveaux microtubules peuvent se former par une réaction de nucléation. Quand la concentration de tubuline intégrée à un microtubule atteint la valeur nulle, alors c'est que le microtubule n'existe plus ; il est donc éliminé de la population de microtubules. Inversement, de nouveaux microtubules peuvent spontanément se former à partir de la tubuline-GTP libre dans la solution. Dans le modèle ils se forment de la façon suivante. Des centres potentiels de nucléation constitués de petits oligomères de tubuline peuvent apparaître en tout endroit de l'espace réactionnel. Leur concentration au cours du temps est stockée dans un tableau bidimensionnel, de la même façon que sont mémorisées les concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. Leur concentration dépend exponentiellement de la concentration en tubuline active $TGTP_{eff}$, ainsi que cela a été proposé par Marx et Mandelkow [Marx and Mandelkow 1994]. La variation de la concentration en oligomères en un point de la grille de réaction est définie par la relation suivante :

$$\frac{d[Oligomers]}{dt} = q_{nuc} \cdot \exp\left(\frac{[TGTP_{eff}] - z_{nuc}}{s_{nuc}}\right) \quad (19)$$

Un nouveau microtubule individuel de courte taille est généré en un point de l'espace réactionnel lorsque la concentration en oligomères en ce point dépasse une certaine valeur. Cette concentration critique a été arbitrairement choisie. Elle est de $2.3 \cdot 10^{-3} \text{ mg.ml}^{-1}$ ce qui est équivalent à 13 dimères de tubuline présents en un point ($1\mu\text{m}$ de côté) de l'espace de réaction. Ce nombre correspond au nombre de dimères de tubuline nécessaires pour former un anneau de tubuline, c'est-à-dire en quelle que sorte un microtubule minimal.

4. Implémentation informatique

Nous ne nous étendrons pas sur les détails de l'implémentation informatique de notre modèle car cela serait très long, le code nécessaire au fonctionnement du programme étant plutôt imposant, et surtout parce que cela n'apporterait guère plus que ce que nous avons décrit précédemment pour comprendre son fonctionnement.

Signalons toutefois que le programme de simulation ainsi que de nombreux outils d'analyse des données produites par les simulations, ont été développés en langage C⁺⁺. Le

code objet a été écrit de façon à pouvoir être utilisé sous n'importe quel type de machine de calcul. Il a été compilé par un compilateur standard, le GCC GNU version 2.95.2. Le programme a été développé sur PC, mais la lourdeur des calculs a nécessité des calculs sur des stations de calcul Alpha cadencées à 500 MHz et disposant de 512 Mo à 2 Go de mémoire vive (Deux stations tri-processeurs alpha 21164A cadencés à 533 MHz avec 512 Mo de RAM, une station XP1000 Alpha 21264 cadencé à 500 MHz avec 1280 Mo de RAM et une station XP1000 bi-processeurs alpha 21264A cadencés à 667 MHz avec 2 Go de RAM). Sur ces machines puissantes, une utilisation de la totalité de la puissance de calcul demandait pour chaque grosse simulation entre trois semaines et un mois de calculs (pour des simulations sur un espace réactionnel de $400 \times 400 \mu\text{m}$ et pour un temps de réaction simulé de 2 à 3 heures). Le volume de données obtenues à chaque simulation de ce type avoisinait le Gigaoctet.

En ce qui concerne la représentation informatique, le programme bénéficiant de la technologie objet, a été développé de façon modulaire. Ainsi, il existe un module pour les microtubules, un module pour l'environnement réactionnel et un module pour le maillage, chacun de ces modules pouvant être modifié, mis à jour, ou même utilisé indépendamment. L'ensemble du programme est paramétré et les jeux de paramètres ont été également gérés de façon modulaire : il y a un module pour les paramètres réactionnels, un pour les paramètres temporels, un pour les paramètres concernant l'aspect et le comportement physique des microtubules et un dernier pour la gestion de l'environnement réactionnel et du maillage. Cette modularité permet la réutilisation indépendante des composants et est un gage de l'évolutivité du modèle. Rajouter des éléments au programme suite à une modification du modèle est très simple à partir de notre architecture modulaire. Par exemple, créer une autre population de microtubules gérée indépendamment dans le modèle, comme des microtubules centriolaires ne demande que très peu de travail. Notre modèle est générique et peut donc facilement être modifié, voire exploité différemment pour d'autres problèmes qui n'ont rien à voir avec les microtubules.

Ces modules ont également été exploités pour créer des outils de traitement des données des simulations. Ces outils ont permis notamment de calculer la biréfringence des microtubules simulés, les figures de corrélation des morphologies microtubulaires simulées, les fluctuations de densité, les diagrammes de répartition des longueurs des microtubules, ou plus simplement à visualiser simplement les films des motifs de concentration en tubuline-GTP, tubuline-GDP ou microtubules.

Chapitre 2 - Résultats des simulations numériques

Dans ce chapitre, une synthèse des résultats des simulations numérique est présentée. Nous nous attachons à comparer chacun des résultats obtenus avec les observations expérimentales. Nous montrons que notre modèle qui repose sur des observations et des données expérimentales permet, non seulement d'obtenir des cinétiques réactionnelles réalistes pour la population de microtubules, mais aussi son auto-organisation. La façon dont interviennent les champs externes dans le processus a également été explicitée. Enfin, nous proposons quelques processus selon lesquels les microtubules pourraient s'organiser dans les cellules vivantes : d'autres sources de rupture de symétrie que les champs externes existent dans les cellules et pourraient bien assurer une organisation minimale du cytosquelette.

1. Cinétiques d'assemblage

Dans une préparation de microtubules, une description vraiment complète des cinétiques réactionnelles nécessiterait de connaître le comportement détaillé de chacun des microtubules. Les microtubules individuels peuvent montrer des comportements très variés dans une même préparation. Certains d'entre eux sont dans une phase de treadmilling, d'autres en instabilité dynamique, et d'autres encore sont en phase de pure croissance ou décroissance. Dans les expériences, il est particulièrement difficile de déterminer les comportements cinétiques des microtubules individuels, car ceux-ci sont difficilement observables. De plus, dans une même solution, aucun des microtubules n'a exactement le même comportement. C'est d'ailleurs en partie pour cette raison qu'il est difficile expérimentalement d'établir une cinétique réactionnelle générale pour chacune des extrémités d'un microtubule et qui, en fonction des conditions de réaction, amène le microtubule à adopter tel ou tel type de comportement. Ce que l'on peut mesurer facilement expérimentalement, c'est le comportement cinétique de l'ensemble de la solution, autrement dit la concentration en microtubules dans la solution. Mais, là non plus, il n'est pas possible de connaître le comportement d'un microtubule individuel à partir de la cinétique moyenne de la population : la moyenne écrase les comportements particuliers. Cependant, dans les simulations numériques, vu que nous simulons individuellement chacun des microtubules de la solution,

nous pouvons suivre, en même temps, le comportement individuel de chaque microtubule et la cinétique réactionnelle moyenne de la population toute entière.

Dans les systèmes hors équilibre thermodynamique, l'auto-organisation est intimement reliée à une instabilité au moment dit 'de bifurcation'. Nous l'avons déjà vu, un des aspects majeurs de l'auto-organisation microtubulaire est justement que leur cinétique réactionnelle montre, aux alentours de la 6^{ème} minute, une forte instabilité réactive dont la présence est indispensable à l'auto-organisation. Après une période d'assemblage intense, les microtubules subissent un fort désassemblage, faisant chuter la concentration en microtubules de plus de 20% de la concentration maximale atteinte à l'instant de bifurcation. Il était donc essentiel que dans les simulations nous retrouvions le même type de comportement cinétique.

Afin d'obtenir des paramètres cinétiques qui donnent ce type de comportement, nous avons procédé de la manière suivante. Les conditions expérimentales qui donnent lieu à des oscillations temporelles périodiques amorties de la concentration en microtubules sont très proches de celles qui permettent d'obtenir un 'overshoot', c'est-à-dire qui aboutissent à leur auto-organisation. Dans le cas des oscillations, les paramètres cinétiques d'un microtubule individuel sont plus faciles à établir car leur cinétique est proche de celle de la solution toute entière [Marx and Mandelkow 1994, Sept et al 1999]. En effet, dans ces solutions, les microtubules sont synchronisés et se comportent donc globalement tous de la même façon. Nous avons donc lancé des simulations en fixant les paramètres correspondants à ce type de comportement. Les simulations débutaient avec une concentration uniforme de 10 mg.ml⁻¹ de tubuline-GTP, sans tubuline-GDP et sans microtubules. Les cinétiques moyennes d'assemblage ont été calculées tout du long des simulations. Plusieurs simulations ont été faites en ajustant progressivement les paramètres utilisés au départ afin d'aboutir à un comportement oscillatoire général proche de la réalité. Un des paramètres critiques pour obtenir des oscillations est k_{reg} , la constante de vitesse de régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP [Pirollet et al 1987, Melki et al 1988]. Comme dans les observations des microtubules in vitro, des oscillations amorties ont été obtenues pour une valeur de la constante de régénération de 0.02 s⁻¹ (Figure 39 A). Tous les paramètres, excepté cette constante, ont été conservés tels quels (cf. 3^{ème} Section du 1^{er} Chapitre de cette Partie). Pour annuler ces oscillations, la constante de régénération doit être égale à 0.2 s⁻¹. Dans ce cas, au lieu de présenter des oscillations, la cinétique se comporte comme celle d'une solution de microtubules en train de s'auto-organiser, c'est-à-dire qu'elle présente un 'overshoot' aux alentours de 3 à 6 minutes (selon les valeurs de certains paramètres, notamment les

paramètres de nucléation). Dans les simulations, le désassemblage intense suivant l'overshoot fait chuter la concentration en microtubules d'environ 25 % (Figure 39 B).

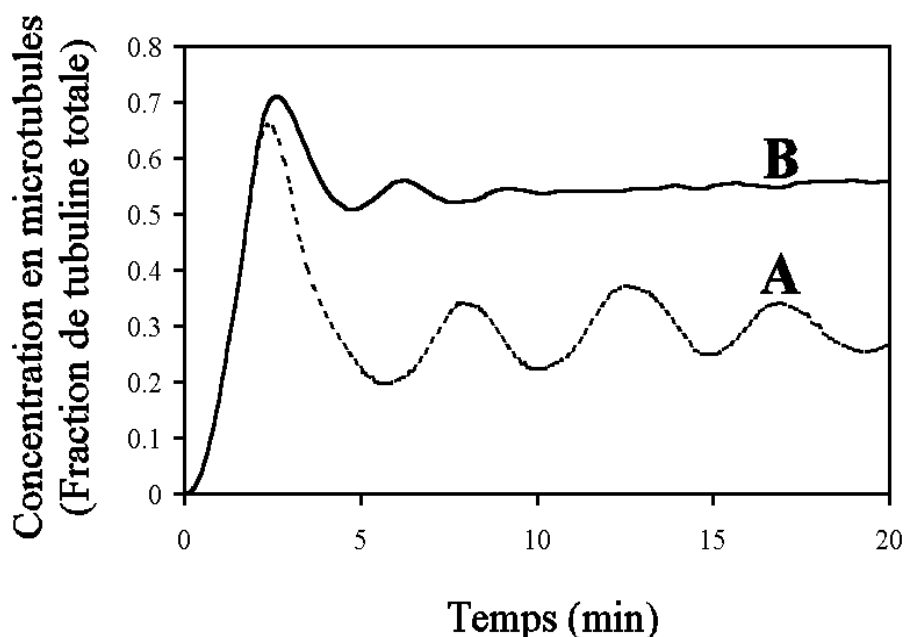


Figure 39. Cinétiques d'assemblage d'une population de microtubules simulés. La simulation (A) montre des oscillations de la concentration en microtubules tandis que la simulation (B) montre une cinétique comprenant un 'overshoot'. La seule différence entre ces deux simulations est le paramètre k_{reg} contrôlant la régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP. (A) $k_{reg}=0.02\text{ s}^{-1}$; (B) $k_{reg}=0.2\text{ s}^{-1}$.

Dans le cas des simulations dans lesquelles nous avons obtenu un 'overshoot', la figure 40 montre la répartition de taille des microtubules après 5 heures de réaction simulée.

Les microtubules simulés se stabilisent à une longueur moyenne avoisinant $10\text{ }\mu\text{m}$. La majorité des microtubules a une longueur comprise entre 2 et $20\text{ }\mu\text{m}$. Certains microtubules cependant peuvent atteindre une taille de plus de $50\text{ }\mu\text{m}$. Ceci est tout à fait comparable avec les tailles des microtubules déterminées expérimentalement dans les solutions auto-organisées ou dans des conditions réactives proches.

La figure 41 montre au cours du temps, les changements de longueur d'un microtubule individuel pris dans la population. Son comportement, comparé à celui de la population toute entière (Figure 39 B), n'a vraiment rien à voir, et cela illustre bien ce que nous disions précédemment quant au peu de rapport qu'il existe entre ces deux niveaux. Le comportement de ce microtubule, ou de tout autre microtubule pris dans la population, a un aspect stochastique ce qui n'est pas du tout le cas de la population.

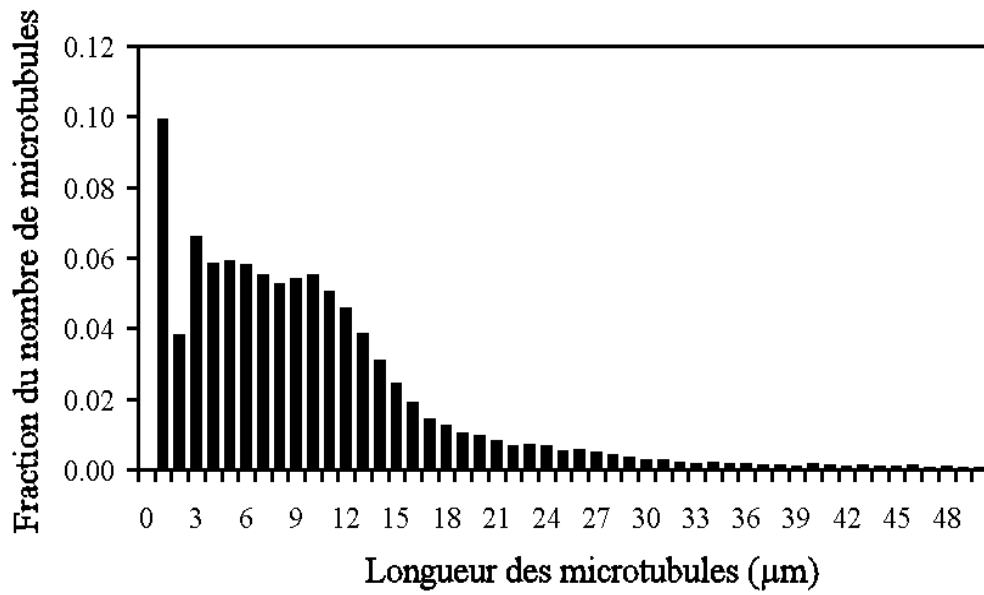


Figure 40. Distribution de longueur des microtubules simulés après 3 heures de temps de réaction obtenue lors de la simulation (B) montrée figure 39.

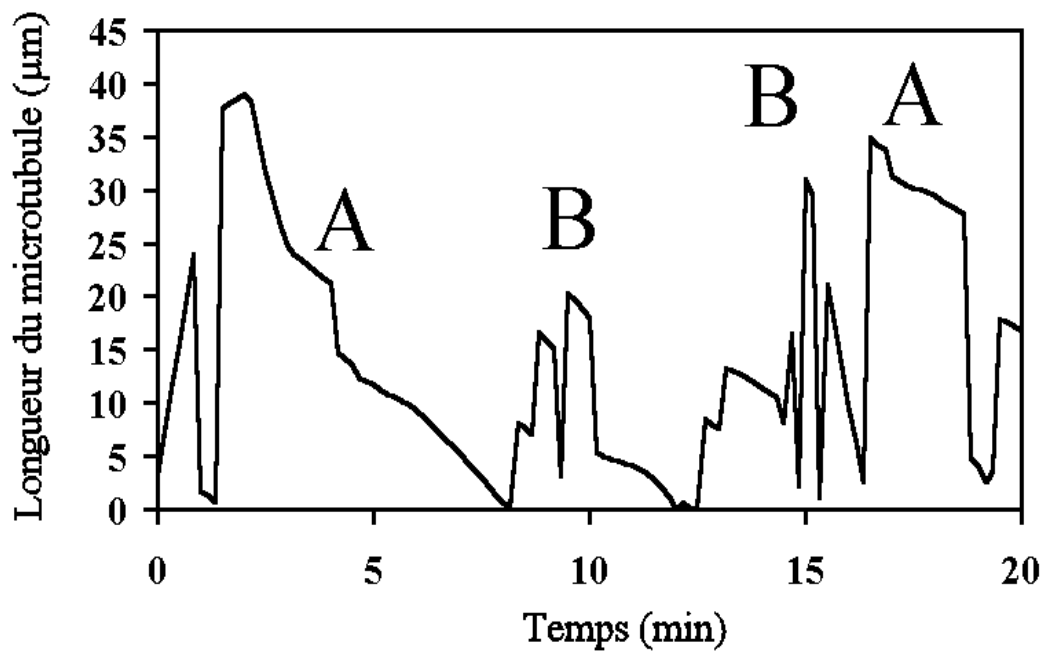


Figure 41. Variations de la longueur, en fonction du temps, d'un microtubule pris individuellement dans une large population de microtubules en train de s'auto-organiser. Différents comportements sont visibles, allant du treadmilling (A) à l'instabilité dynamique (B).

A chaque instant, des microtubules sont en phase de treadmilling, tandis que d'autres sont plutôt en instabilité dynamique, mais la moyenne de tous les comportements individuels est régulière et reproductible d'une expérience ou d'une simulation à l'autre. Une remarque importante que l'on puisse faire à ce propos est que, si les microtubules ne communiquaient pas entre eux, la moyenne de tous les comportements individuels aurait toutes les chances d'avoir également un comportement à l'aspect stochastique. Le fait que l'on obtienne une cinétique globale tout à fait déterministe indique que, d'une part, ce que l'on peut prendre pour un comportement stochastique concernant les microtubules individuels, ne l'est pas, et que, d'autre part, la cinétique globale obtenue est l'émergence d'un très grand nombre d'éléments, les microtubules, qui se comportent entre eux de façon collective. A titre de comparaison, si l'on suivait le comportement individuel d'une fourmi, avec ses arrêts, ses changements de direction, etc, ce comportement aurait probablement un aspect stochastique. L'ensemble de la population d'insecte, en revanche, a un comportement déterministe et génère une structure ordonnée.

Une conclusion importante à propos de ces mesures faites sur le système pris dans son ensemble, est qu'en simulant une population de microtubules ayant chacun une cinétique indépendante et réaliste au niveau individuel, nous parvenons à reproduire les comportements cinétiques mesurés expérimentalement. Nous verrons qu'à ces comportements cinétiques réalistes, sont associés des comportements spatiaux réalistes.

2. Formation des traînées chimiques

Un des points que nous souhaitions évidemment vérifier était que les simulations pouvaient bien prédire la formation des traînées chimiques dont nous avons fait l'hypothèse (cf. 1^{ère} Section du 1^{er} Chapitre de cette Partie), c'est-à-dire que les microtubules dont nous n'avons décrit que la cinétique générale aux extrémités étaient capables de 'treadmilling' (comportement non programmé). En outre, il fallait surtout s'assurer que ces traînées chimiques jouaient bien le rôle que nous leur prêtons, à savoir la communication entre les microtubules et la formation de faisceaux de microtubules regroupés dans ces traînées.

Il est, bien entendu, impossible d'étudier ce phénomène dans une population composée de plusieurs milliers de microtubules aux directions très variées et complètement enchevêtrés dans tout l'espace réactionnel. Pour tester cela, nous avons donc réalisé une simulation simple dans un espace réactionnel de 100 μm par 60 μm de côté et contenant seulement 5 microtubules. Dans cette simulation nous n'avons pas permis à la nucléation

d'autres microtubules de se faire. Deux microtubules préformés de 10 μm de long (a,b) ont été placés l'un à côté de l'autre et de façon parallèle, leurs deux extrémités croissantes pointant dans la même direction. A 10 μm derrière les extrémités décroissantes de ces microtubules, nous avons placé trois autres microtubules (c,d,e). Ces derniers étaient également disposés de façon parallèle entre eux et par rapport aux deux premiers microtubules (a et b), mais espacés entre eux de 5 μm . Leurs extrémités croissantes étaient toutes dirigées dans le même sens, vers les extrémités décroissantes des deux premiers microtubules a et b afin tous les cinq aient la même direction de croissance. Les concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP étaient initialement uniformes. N'étant pas dans des conditions réalistes, c'est-à-dire avec un très grand nombre de microtubules, il était impossible dans des conditions standard de faire en sorte que les cinq microtubules soient en phase de treadmilling. Les concentrations en tubuline-GTP et tubuline-GDP ont été choisies pour qu'il en soit ainsi, à savoir une concentration de 4 mg.ml⁻¹ pour la tubuline-GTP et une concentration nulle sur tout l'espace de réaction pour la tubuline-GDP. Les paramètres de réaction utilisés étaient ceux qui permettent d'obtenir un 'overshoot' dans la cinétique d'assemblage.

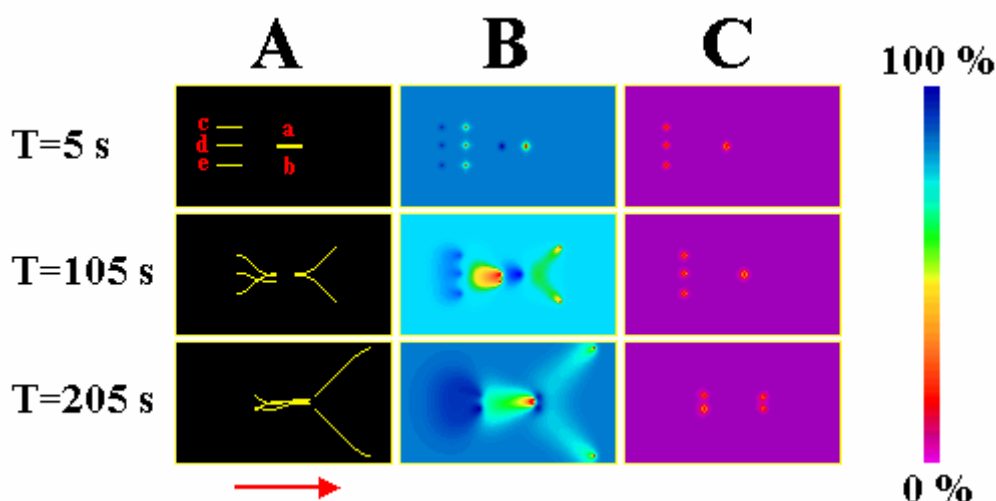


Figure 42. Formation de traînées chimiques et de faisceaux de microtubules dans les simulations numériques. En (A), on suit le devenir de 5 microtubules. En (B) et (C), on peut suivre l'évolution spatiale des concentrations respectives en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. Initialement, 5 microtubules ont été disposés comme cela est montré à $t=0$ sec. Les extrémités croissantes des microtubules forment des régions déplétées en tubuline-GTP tandis que les extrémités décroissantes libèrent localement de la tubuline-GDP. Les microtubules (a) et (b) s'éloignent l'un de l'autre, car ils se dirigent vers les zones les plus concentrées en tubuline-GTP et évitent la déplétion causée par leur

voisin. Inversement, les microtubules (c), (d), (e) dévient progressivement et s'allongent dans la traînée concentrée de tubuline-GTP produite par les extrémités décroissantes de (a) et (b).

La figure 42 montre la position des microtubules et les profils de concentration en tubuline-GTP et en tubuline-GDP tels qu'ils ont été calculés à différents temps de la réaction. L'ajout de tubuline-GTP à l'extrémité croissante et le rejet de tubuline à l'extrémité décroissante provoquent le déplacement des microtubules à une vitesse de l'ordre de 5 μm par minute. Comme les microtubules consomment de la tubuline-GTP pour avancer, l'espace de réaction au niveau des extrémités et à leurs alentours est déplété en tubuline-GTP. En conséquence, les deux microtubules de devant (a et b) qui étaient initialement collés l'un contre l'autre et parallèles entre eux, s'éloignent l'un de l'autre. Cela s'explique parce qu'il est plus favorable pour eux de dévier de leurs trajectoires pour croître dans les régions riches en tubuline-GTP, plutôt que dans les régions qui en sont déplétées, notamment à cause de l'assemblage de leur proche voisin. Les extrémités décroissantes, quant à elles, libèrent de la tubuline-GDP qui est progressivement convertie en tubuline-GTP. De ce fait, juste derrière l'extrémité décroissante, se forme une petite zone contenant de la tubuline-GDP concentrée. Cette zone est suivie d'une longue traînée de tubuline-GTP qui diffuse peu à peu, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'extrémité décroissante. Nous avons observé que les trois microtubules c, d, e, ont dévié de leur trajectoire pour se réunir progressivement dans la traînée concentrée de tubuline-GTP libérée par les deux microtubules de tête. Dans les conditions appropriées, ceci est donc très efficace pour regrouper des microtubules dans une même direction. Ce phénomène fournit une explication sur la façon dont se forment les faisceaux de microtubules, rassemblements de quelques microtubules alignés entre eux.

Un autre phénomène important observé dans cette simulation concernait la façon dont se comportaient les microtubules au voisinage des parois. Nous avons dit que les deux microtubules de tête s'éloignaient les uns des autres parce qu'ils cherchaient à éviter la déplétion de tubuline-GTP qu'ils produisaient eux-mêmes. Si on laisse la simulation évoluer plus longtemps, jusqu'à ce que les microtubules de tête arrivent au voisinage des limites de l'espace de réaction, on observe le même phénomène : un microtubule qui arrive au niveau d'une paroi va dévier peu à peu pour éviter la déplétion de tubuline-GTP qu'il provoque lui-même (Figure 43). C'est grâce à ce processus que les microtubules parviennent à 'sentir' les limites de l'échantillon. Sachant ceci, on comprend que les parois des échantillons puissent rompre la symétrie de la réaction et induire une auto-organisation, au moins partielle, de la solution.

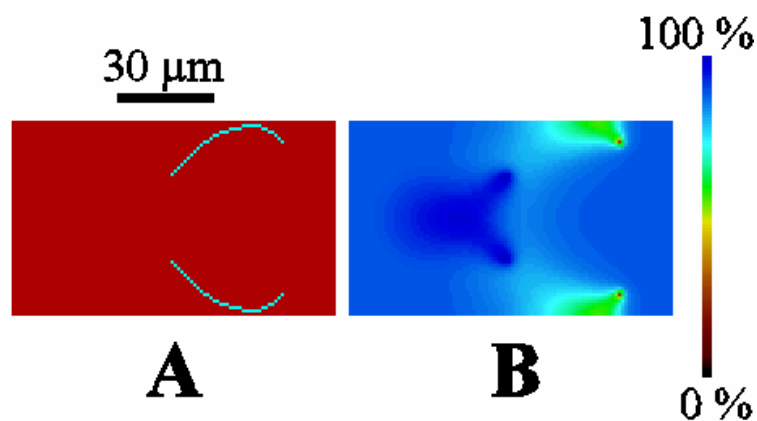


Figure 43. *Phénomène d'évitement des parois par les microtubules. Deux microtubules (A) ont été initialement disposés de façon parallèle, comme les microtubules (a) et (b) de la figure 42. Après avoir dévié, ils finissent par arriver au niveau des parois imperméables qui simulent les parois en verre d'une cuve. À ce moment, ils dévient de leur trajectoire pour s'éloigner de la déplétion de tubuline-GTP (B) qu'ils créent pour se diriger vers les zones favorables à leur croissance.*

3. Auto-organisation des microtubules

"La vie [de l'animal ou du végétal] ne paroît être que le résultat de toutes les actions, de toutes les petites vies particulières (s'il m'est permis de m'exprimer ainsi) de chacune de ces molécules actives, dont la vie est primitive & paroît ne pouvoir être détruite" Buffon (f)

3.1. Formation de morphologies auto-organisées

Après avoir testé le fonctionnement du modèle avec quelques microtubules, nous avons permis à la nucléation des microtubules de se faire. Les simulations ont donc été étendues à des populations de $4 \cdot 10^4$ à $7 \cdot 10^5$ microtubules sur des surfaces respectivement de $100 \mu\text{m}$ par $100 \mu\text{m}$ et de $400 \mu\text{m}$ par $400 \mu\text{m}$. Ces simulations utilisaient les paramètres décrits précédemment. La constante de diffusion de la tubuline était de $6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ aussi bien pour la tubuline-GTP que pour la tubuline-GDP [Salmon et al 1984], et la constante de vitesse de régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP était de 0.2 s^{-1} [Melki et al 1988].

Dans les expériences, les microtubules se forment initialement à partir d'une solution homogène de tubuline à une concentration de $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ et en présence d'un excès de GTP. Pour imiter ces conditions, nous avons lancé les simulations avec pour conditions initiales

l'absence de microtubules, une concentration nulle de tubuline-GDP dans tout l'échantillon et une distribution uniforme de la tubuline-GTP à une concentration correspondant à 10 mg.ml^{-1} .

Dans ces simulations des rangées alignées de microtubules espacées entre elles d'environ 10 à $15 \mu\text{m}$, se forment. Autrement dit, ce sont des stries de microtubules. Dans une rangée, les terminaisons croissantes des microtubules pointent toutes dans la même direction et les microtubules avancent à la même vitesse, en même front synchronisé. Toutes les extrémités croissantes sont alignées selon un front de croissance régulier, les microtubules étant parallèles entre eux et perpendiculaires au front de croissance (Figure 44). De même, toutes les extrémités décroissantes sont disposées en arrière de la rangée également selon un front de décroissance. Ce front est moins bien défini que pour les extrémités positives. Cela est dû au fait que les vitesses maximales de réaction des extrémités négatives sont plus élevées que celles des extrémités positives.

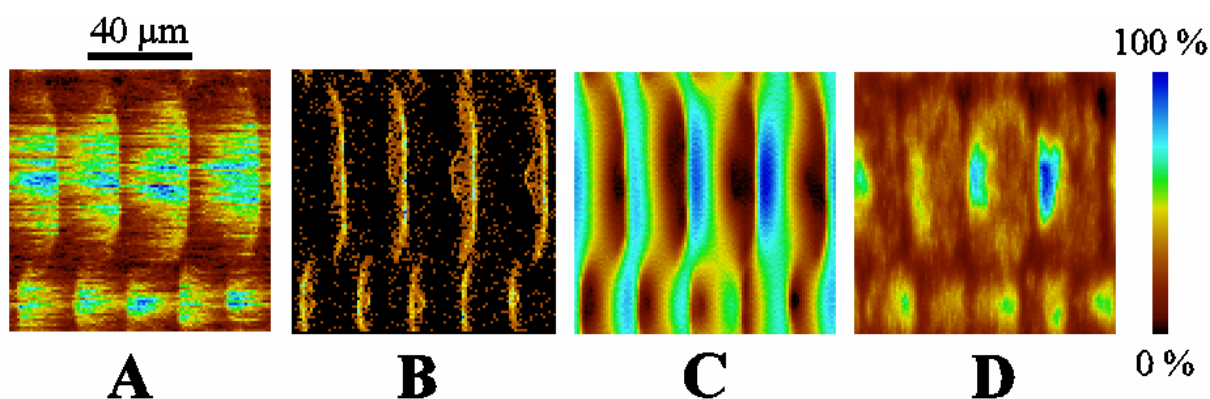


Figure 44. Simulation d'une population de microtubules sur un espace de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. En (A) est représentée la concentration en microtubules, en (B) sont marquées les extrémités positives des microtubules, en (C) le motif de concentration en tubuline-GTP et en (D) celui de tubuline-GDP. Cette figure met en évidence la corrélation entre les motifs striés de microtubules et les motifs de tubuline. Elle montre aussi que les extrémités des microtubules sont parfaitement alignées selon un même front. Dans ce motif, les microtubules sont parallèles entre eux et perpendiculaires au grand axe des stries.

Prises en sandwich entre chaque rangée de microtubules alignés se situent des zones contenant très peu de microtubules, formant des bandes allongées de tubuline. Chacune de ces zones en fait composée de deux parties bien distinctes : une bande de tubuline-GDP suivie d'une bande de tubuline-GTP. Comme on pouvait s'y attendre, les bandes concentrées en tubuline-GDP se forment juste en arrière de chaque strie de microtubules : toutes les extrémités décroissantes alignées produisent une forte concentration de tubuline-GDP. Cette

zone allongée de tubuline-GDP est suivie d'une zone allongée de tubuline-GTP produite par régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP. En résumé, les morphologies auto-organisées qui se forment sont constituées de l'alternance de zones allongées, concentrées en microtubules alignés de façon parallèle. Ce motif macroscopique est complémentaire du motif de tubuline libre : là où se trouvent de fortes concentrations en microtubules, il y a peu de tubuline libre, et inversement. Le motif de tubuline libre est constitué d'une série de zones allongées concentrées en tubuline-GDP suivies de tubuline-GTP (Figure 44).

Comment expliquer le fait que les microtubules restent contenus et restent parallèles dans une rangée et que toutes les extrémités d'un même type soient alignées entre elles ? Que ce soit pour les extrémités positives (ici croissantes) ou pour les extrémités négatives (ici décroissantes), leur agencement dans l'espace et notamment dans les fronts, respectivement de croissance ou de décroissance, est dû à l'autorégulation de leur activité réactive en fonction des concentrations locales en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. Cette autorégulation explique ainsi que les microtubules se synchronisent et que l'intensité et la forme des stries des microtubules se renforcent peu à peu.

Au niveau des extrémités croissantes, chacun des microtubules d'une strie est équidistant des microtubules de la strie située en avant et des régions allongées en tubuline-GDP et en tubuline-GTP qui se situent entre les deux rangées microtubulaires. Lorsqu'un microtubule avance trop vite par rapport à ses voisins, il dépasse la région concentrée en tubuline-GTP et se retrouve dans la région concentrée en tubuline-GDP située plus en avant. Cette région étant peu favorable à sa croissance, le microtubule ralentit. Chacun des microtubules d'une rangée est donc contraint de rester aligné avec les autres. L'autorégulation des extrémités croissantes provient aussi du fait que chacune de ces extrémités induit la formation locale d'une région déplétée en tubuline. La zone allongée déplétée en tubuline-GTP se situe directement en arrière du front croissant de microtubules. Un microtubule du front ne peut ralentir, auquel cas il serait pris dans cette zone défavorable et éliminé de la strie. Les extrémités positives sont donc contenues dans une zone très restreinte de 1 à 3 μm de large, comprise entre la région de forte concentration en tubuline-GDP à l'avant et l'arrière du front d'extrémités positives, c'est-à-dire la zone déplétée en tubuline-GTP.

Au niveau des extrémités décroissantes, le principe est à peu près identique : si une extrémité décroissante ralentit sa vitesse de décroissance, elle reste donc en arrière du front décroissant de microtubules et se retrouve immédiatement dans la région fortement concentrée en tubuline-GDP qu'elle et ses voisines produisent. Cette région étant favorable au désassemblage de l'extrémité, sa vitesse de décroissance augmente et l'extrémité se retrouve à

nouveau, rapidement au niveau des autres extrémités décroissantes. Inversement, si elle décroît plus vite, elle se retrouve dans un environnement encore plus défavorable puisqu'elle arrive dans la région déplétée en tubuline-GTP au niveau des extrémités croissantes. Le microtubule concerné a alors toutes les chances d'être éliminé. Les extrémités négatives sont donc cantonnées dans une zone restreinte de 5 à 10 μm de large, comprise entre les extrémités positives des microtubules à l'avant et la zone fortement concentrée en tubuline-GDP en arrière.

Ainsi, il est aisé de voir comment se développent progressivement ces larges fronts de microtubules alignés à partir de quelques regroupements ou faisceaux microtubulaires (cf. section 2 de ce chapitre) isolés et encore non corrélés spatialement entre eux. Un faisceau microtubulaire qui avance, libère collectivement, en arrière, une traînée macroscopique de tubuline-GDP, rapidement convertie en tubuline-GTP. Cette trace chimique est utilisée par d'autres microtubules qui passent dans son voisinage. D'autres faisceaux se forment et c'est ainsi que se succèdent des vagues de stries microtubulaires. D'autres microtubules viennent s'ajouter à chacun de ces faisceaux et les renforcent peu à peu. Ces nouveaux microtubules peuvent provenir de microtubules nucléés au cœur même de ces faisceaux de microtubules ou bien ce sont des microtubules ou des groupements alignés de microtubules voisins qui rejoignent les stries en formation et se synchronisent avec leurs microtubules. Nos simulations démontrent donc comment des processus de réaction-diffusion peuvent amener à la formation progressive de rangées rectangulaires de microtubules (les stries), dans lesquelles les microtubules avancent dans la même direction de façon synchronisée.

Les stries de microtubules voisines ne fusionnent pas entre elles grâce à ces bandes de tubuline-GDP prises en sandwich entre elles. Entre chaque strie, la concentration en microtubules chute d'environ 55 % par rapport à la concentration en microtubules dans les stries (soit une concentration atteignant seulement 45 % du maximum de concentration). Cela est cohérent avec ce que l'on peut mesurer expérimentalement : *in vitro*, les stries microtubulaires sont espacées entre elles par des régions dont la concentration chute de 30 % (soit une concentration de 70 % du maximum de concentration dans les stries).

Des changements macroscopiques d'orientation des microtubules comme ceux que l'on observe expérimentalement peuvent apparaître de la façon suivante. Comme nous l'avons décrit, de longues rangées de microtubules alignés génèrent de longues bandes macroscopiques riches en tubuline-GTP. La forte concentration en tubuline-GTP favorise la nucléation des microtubules. À cause de la forme allongée et étroite de ces régions, les

microtubules qui sont nucléés dans ces régions ont de grandes chances de croître préférentiellement selon le grand axe de ces régions, perpendiculairement à l'orientation des microtubules dans les deux rangées de microtubules voisines. Ainsi, en plus du motif de concentration, on peut observer un motif d'orientation des microtubules, dans lequel l'orientation des microtubules change de 90° d'une strie à l'autre. Notons cependant que les stries obtenues ainsi (dans les zones de forte concentration en tubuline) sont très peu marquées dans nos simulations. Cela est dû au fait que les deux stries voisines se décalent perpendiculairement à l'axe de celle du milieu. Les microtubules qui se forment dans ces zones ne sont donc que transitoires. Pour que des stries perpendiculaires puissent réellement perdurer, il faudrait que les premières stries deviennent peu à peu stationnaires pour laisser les autres s'établir entre elles.

Une fois que des régions concentrées en microtubules et ayant une orientation préférentielle ont commencé à se former, le mécanisme d'auto-amplification que nous avons déjà décrit renforce progressivement le motif.

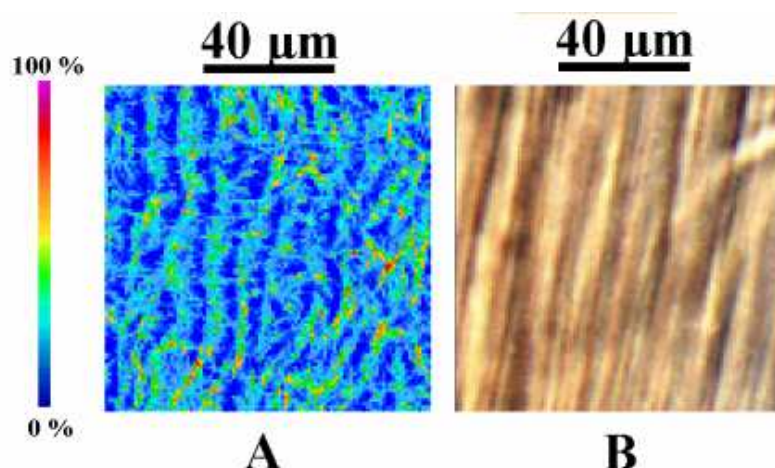


Figure 45. Comparaison entre le motif microtubulaire observé expérimentalement et celui obtenu par simulations numériques. La simulation (A) contient environ $4 \cdot 10^4$ microtubules sur un espace bidimensionnel de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. Une structure auto-organisée *in vitro* vue à la même échelle (B).

Dans les simulations, l'obtention de morphologies correctement auto-organisées nécessite environ 10^6 itérations, ce qui à raison de 0.01 s par itération correspond à environ 3 heures de temps de réaction. Lors des expériences, l'auto-organisation prend environ 5 heures. En accord avec les expériences, les microtubules se forment initialement dans une solution de tubuline, sans orientations privilégiées et sont uniformément distribués dans tout l'échantillon.

L'auto-organisation apparaît progressivement à partir de telles conditions comme nous l'avons précédemment décrit. À cause du nombre important de calculs, il est difficile d'étendre davantage les surfaces de nos simulations, et il est complètement impossible de simuler des zones de plusieurs centimètres de côté comme dans les expériences. Comme nous l'avons décrit lors de la présentation des microtubules dans la partie introductive, la structure auto-organisée contient des niveaux d'organisation de l'ordre du micromètre. On peut donc comparer les structures qui se forment dans les simulations numériques avec les observations expérimentales faites à une échelle comparable. La figure 45 montre la forte similarité entre les résultats de simulation et les résultats expérimentaux.

Malgré cela, il est important de dire que nous ne sommes pas parvenus à obtenir de motif auto-organisé comprenant des stries microtubulaires stationnaires. Expérimentalement, les stries observées, une fois la morphologie terminée, ne se déplacent pas. Dans le cas des oscillations de concentration microtubulaires, dans certaines conditions, on peut observer la formation d'ondes de microtubules se déplaçant à travers l'échantillon à des vitesses élevées de l'ordre de 1 mm.min^{-1} [Mandelkow et al 1989]. Ce comportement est à la limite de l'auto-organisation, mais aucune strie microtubulaire stationnaire ne se forme. Il semble que nos simulations se situent entre ces deux comportements très proches. Il est possible que cela soit imputable aux imperfections certaines du modèle et surtout à un jeu de paramètres inexacts. Il serait vain d'essayer d'obtenir un modèle parfait. Ce n'est d'ailleurs pas l'objectif que nous recherchons. Montrer que des motifs microtubulaires auto-organisés peuvent se former par des processus collectifs de réaction-diffusion est déjà un pas important. Notons toutefois qu'*in vitro*, à cette échelle microscopique, les stries de microtubules ne présentent pas entre elles des alternances d'orientation des microtubules : d'une strie à l'autre, les microtubules ont la même orientation. C'est à un niveau de striation supérieur que se fait cette alternance. Les résultats que nous avons obtenus expérimentalement sont donc en accord avec cette observation. Peut-être que ceci serait observable dans des simulations de dimensions plus élevées, nécessitent malheureusement des calculs actuellement hors de portée de notre puissance de calcul.

3.2. Influence des paramètres sur l'auto-organisation

Les facteurs contrôlant les dynamiques microtubulaires sont complexes ; le comportement des microtubules est en conséquence très riche. L'étude systématique de l'influence de chacun de ces paramètres sur l'auto-organisation serait très longue et

particulièrement fastidieuse. Cependant, nous savons d'après les expériences que l'auto-organisation est particulièrement sensible à certains paramètres réactionnels. Les paramètres qui affectent l'auto-organisation sont la plupart du temps couplés entre eux et difficilement dissociables. Malgré cela les facteurs suivants permettent de voir certains aspects qualitatifs des bases moléculaires de l'auto-organisation. Les facteurs principaux sont la constante de diffusion de la tubuline, les vitesses de croissance et de décroissance des microtubules, la densité de microtubules, autrement dit la fréquence de nucléation des microtubules, et la vitesse de régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP.

Le mécanisme fondamental pour l'auto-organisation des microtubules dans ce modèle est le couplage entre les microtubules par l'intermédiaire des traînées chimiques produites par les microtubules voisins. La portée de ces traînées dépend de la constante de diffusion de la tubuline libre. Si la diffusion est très rapide alors aucune auto-organisation ne se fait. Elle ne se fait pas non plus si la diffusion est très lente. Pour que le mécanisme fonctionne, un microtubule individuel doit être à portée de diffusion des traînées chimiques produites par les microtubules voisins. L'augmentation de la vitesse de la diffusion provoque l'augmentation de l'espacement des stries microtubulaires. Expérimentalement, il est difficile de diminuer ou d'augmenter la vitesse de la diffusion de la tubuline. On peut quand même parvenir à la ralentir un peu sans perturber la cinétique des microtubules en ajoutant des grosses molécules qui freinent la diffusion comme le Ficoll 400 à 5 % ou bien en gélifiant légèrement le milieu avec un gel d'agarose à 0.1 %. Dans ce cas, on observe effectivement une nette diminution de l'auto-organisation.

La distance moyenne entre les microtubules voisins diminue lorsqu'on augmente la concentration initiale en tubuline car la nucléation de nouveaux microtubules est en conséquence plus élevée. L'auto-organisation apparaît donc plus rapidement quand la concentration en tubuline est initialement plus élevée. C'est également le cas expérimentalement : l'auto-organisation se fait très mal avec une concentration initiale de tubuline inférieure à 5 mg.ml^{-1} . Au contraire, pour des concentrations élevées de tubuline, par exemple avec 20 mg.ml^{-1} de tubuline, la solution s'auto-organise en 2 ou 3 heures contre 5 heures habituellement et la morphologie présente des stries plus resserrées et plus finement formées.

Comme les traînées chimiques sont formées par des microtubules individuels qui s'allongent d'une extrémité et raccourcissent de l'autre, l'auto-organisation dépend des vitesses de croissance et de décroissance des microtubules. Expérimentalement, ceci est

vérifiable en utilisant des substances qui augmentent la réactivité des microtubules (ex: magnésium), ou, au contraire, les stabilisent (ex: Taxol).

Dans les simulations, durant l'auto-organisation, les vitesses de croissance et de décroissance des microtubules deviennent peu à peu semblables : les microtubules entrent dans une phase de treadmilling. Quand l'auto-organisation apparaît, la vitesse de croissance d'un microtubule qui croît dans la trace laissée par un microtubule voisin situé en avant, va s'ajuster pour devenir peu à peu semblable à la vitesse de décroissance de ce microtubule. Si la vitesse de croissance est trop lente alors le microtubule en arrière va progressivement se retrouver de plus en plus éloigné de l'extrémité du microtubule devant lui et va, au bout d'un moment, être hors de portée de la traînée de tubuline-GTP. Inversement, un microtubule dont la vitesse maximale de croissance est très élevée, supérieure à la vitesse de désassemblage du microtubule devant lui, doit être en mesure d'ajuster correctement cette vitesse de croissance pour se synchroniser avec le microtubule qui est devant lui. Donc, dans une certaine limite, l'auto-organisation se fait dans des conditions qui favorisent l'apparition du treadmilling chez les microtubules, plutôt qu'une instabilité dynamique permanente. Ceci étant dit, une certaine propension à l'instabilité dynamique est nécessaire. Outre le fait que cela permet d'obtenir à l'échelle de la solution un 'overshoot' dans la cinétique d'assemblage, instabilité requise pour l'auto-organisation, des paramètres réactionnels autorisant l'instabilité dynamique permettent aux microtubules d'ajuster correctement leurs vitesses de croissance ou de décroissance. C'est à cette condition que les microtubules peuvent s'auto-organiser en stries régulières en utilisant les traînées chimiques. Au fur et à mesure que l'auto-organisation se développe, la réactivité des microtubules s'ajuste et ils se stabilisent pour adopter un régime de 'treadmilling'. Au début du processus, les microtubules sont moins stables que lorsque le processus est avancé pour deux raisons. Premièrement, au début de la réaction, la nucléation est un phénomène très actif du fait de la forte concentration en tubuline active. Cela génère une grande quantité de courts microtubules. Chaque microtubule comporte deux extrémités réactives, toutes les deux croissantes à ce stade de la réaction. Toutes ces extrémités sont bien plus réactives que celles d'un plus petit nombre de microtubules de grande taille qui seraient en phase de treadmilling. Ceci induit une très forte consommation de tubuline-GTP dans tout l'échantillon. Quand la concentration en tubuline-GTP passe en dessous du seuil critique, les microtubules ne peuvent plus s'assembler et entrent alors dans une phase de désassemblage intense. Ceci est une description de l'overshoot. On comprend donc le rôle de la fréquence de nucléation : plus elle est élevée, plus le nombre de courts microtubules générés au départ est élevé. Ce paramètre, lorsqu'il est augmenté peut aboutir à une succession de phases d'assemblage et de

désassemblage intenses, autrement dit à des oscillations de la concentration en microtubules et à la perte de l'auto-organisation. Ceci est cohérent avec les observations expérimentales : la nucléation joue un rôle majeur dans l'existence d'oscillations [Obermann et al 1990]. Deuxièmement, n'oublions pas qu'au fur et à mesure que l'auto-organisation des microtubules se met en place, ceux-ci se synchronisent entre eux, diminuant ainsi l'instabilité dynamique dans la population. C'est également le cas dans les préparations *in vitro*. Expérimentalement, la stabilisation des microtubules se traduit par une baisse de leur réactivité. Ceci a été observé en suivant la consommation de GTP au cours du temps par spectrométrie RMN du phosphore. Durant l'auto-organisation, la réactivité des microtubules est très élevée car la consommation de GTP est importante; par contre, une fois l'auto-organisation terminée, la réactivité des microtubules diminue fortement car la consommation d'énergie chimique est bien moindre [Tabony and Papaseit 1998].

Enfin, comme cela a été décrit précédemment, l'auto-organisation est fortement dépendante de la vitesse de régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP. Si cette vitesse est nulle, alors la tubuline-GDP n'est pas régénérée. Non seulement le stock initial de tubuline-GTP s'épuise, mais aussi, à niveau moléculaire, aucune traînée de tubuline-GTP ne peut se former. Dans ce cas, bien évidemment, aucune auto-organisation ne peut se faire. Pour que l'auto-organisation apparaisse, la vitesse de régénération de la tubuline-GDP en tubuline-GTP doit donc être suffisamment rapide. Cela est également cohérent avec les observations expérimentales dans le sens où une vitesse de régénération plus lente produit des oscillations microtubulaires [Melki et al 1988].

3.3. Simulation des champs externes et autres sources de rupture de symétrie

3.3.1. Gravité et fluctuations de densité

Une des propriétés majeures des préparations de microtubules auto-organisées *in vitro* est leur dépendance vis-à-vis de la gravité. La gravité brise la symétrie du processus de réaction-diffusion. Sa présence au moment d'instabilité du système provoque l'auto-organisation globale de l'échantillon en le faisant bifurquer vers une morphologie macroscopique striée. Les simulations numériques doivent montrer ce type de comportement. Un des résultats des simulations est que, durant les premières minutes du processus, avant que l'auto-organisation n'apparaisse, les régions concentrées en microtubules coïncident avec les régions concentrées en tubuline libre. Nous avons déjà mentionné ce phénomène

'd'aspiration' de la tubuline libre dans la description des bases moléculaires de l'auto-organisation (cf. 1^{ère} section du 1^{er} chapitre de cette partie). Ceci signifie que des différences de densité significatives sont présentes dans la solution à un moment précoce du processus.

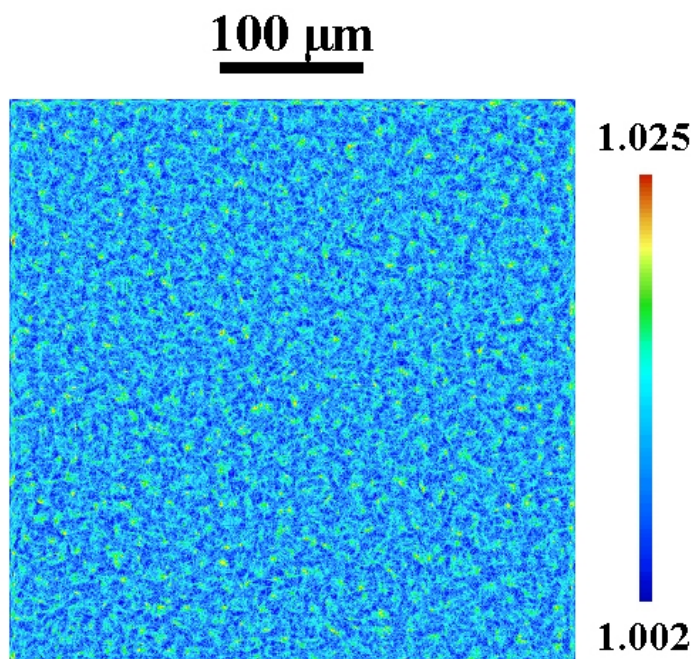


Figure 46. Le modèle prédit l'apparition de fortes fluctuations de densité dans la solution de microtubules au moment de l'overshoot. Les écarts de densité sont de l'ordre de 2 à 3 %. Ces fluctuations de densité sont essentiellement dues aux différences de concentration en microtubules.

Dans les simulations, la densité est calculée à partir de la quantité de tubuline totale en un point, c'est-à-dire à partir des concentrations en microtubules, en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. La figure 46 montre les variations de densité calculées au moment d'instabilité du processus (overshoot). De fortes différences de densité apparaissent à la fin de la période d'assemblage intense, c'est-à-dire quand le désassemblage intense commence, juste avant le début de l'overshoot. C'est également à ce moment que les préparations *in vitro* sont capables d'interagir avec la gravité. A cet instant, les fluctuations sont des petites zones de 5 μm de diamètre environ et leur densité est d'environ $5 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-2}$. La différence entre le maximum et le minimum de densité est d'environ 2 à 3 %. L'intensité calculée de l'interaction d'une telle fluctuation de densité avec un champ de gravité de 1 g est équivalente à 30 kT, autrement dit, la force d'interaction avec la gravité est trente fois supérieure à celle due à l'agitation thermique qui est d'une fois kT. Cela est amplement suffisant pour contrer les effets dus à l'agitation thermique. Au fur et à mesure que l'auto-organisation se développe, en présence de

gravité, ces fluctuations de densité, essentiellement dues à la concentration en microtubules, vont fusionner entre elles et former les bandes de microtubules auto-organisés que nous avons décrit précédemment.

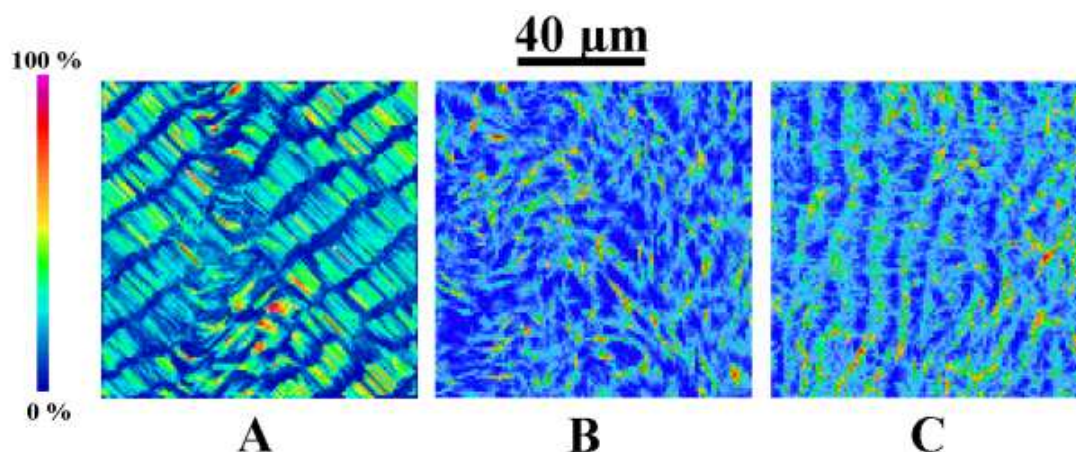


Figure 47. Influence d'un biais directionnel dans le processus de réaction-diffusion microtubulaire. Ces simulations de 3 heures de temps de réaction contiennent environ $4 \cdot 10^4$ microtubules sur un espace bidimensionnel de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. La simulation (A) montre la formation de stries en diagonales dues à la présence d'un léger biais numérique dans l'algorithme de la diffusion (cf. Section 2.3 du 1^{er} Chapitre de cette Partie). Lorsqu'on enlève ce biais, des inhomogénéités de concentration non corrélées persistent, mais sans organisation globale de l'échantillon (B). Si on rétablit un biais directionnel, on observe à nouveau la formation d'une morphologie formée de stries dans lesquelles les microtubules sont perpendiculaire à leur grand axe (C). Le biais directionnel imposé est une diffusion asymétrique: ici la diffusion selon l'axe y est deux fois supérieure à la diffusion sur l'axe x.

Lors des premières simulations, nous avons observé la formation de stries de microtubules très bien organisées et disposées de façon diagonale : l'orientation des microtubules était de 45° et perpendiculaire au grand axe des stries (Figure 47 A). Nous ne simulions pourtant pas encore l'effet des champs externes, donc aucune rupture de symétrie provenant d'un champ simulé. Des simulations réalisées dans un tore, donc en l'absence de parois aboutissaient au même résultat. Nous avons donc suspecté qu'une asymétrie favorisant cette orientation diagonale et induisant l'auto-organisation devait se trouver au cœur même de l'algorithme que nous utilisons. C'était effectivement le cas. Comme nous l'avons déjà décrit, la méthode de digitalisation de la diffusion donne naissance à des fronts d'onde carrée. Ainsi, la déplétion en tubuline-GTP qui se forme à chaque extrémité croissante dans la solution, va adopter un profil carré, laissant les régions en diagonale plus concentrées en

tubuline-GTP. Une extrémité en croissance qui recherche les régions concentrées en tubuline-GTP aura donc tendance à se diriger vers les régions en diagonale. Cet effet est très faible, mais au bout de quelques dizaines de milliers d'itérations, sa conséquence apparaît macroscopiquement. Ce résultat, bien que d'origine artéfactuelle, est très instructif car il montre à quel point un très léger facteur externe suffit à déclencher le processus d'auto-organisation à un niveau macroscopique.

Il est possible d'enlever cet effet asymétrique en ajoutant du bruit aléatoire dans l'équation de la diffusion (cf. Section 2.3 du 1^{er} Chapitre de cette Partie). A ce moment là, l'auto-organisation macroscopique de l'échantillon disparaît. Les simulations ne montrent alors plus que des inhomogénéités, d'une dimension de 5 μm environ, dans lesquelles les microtubules sont localement organisés entre eux, mais qui ne sont ni corrélées, ni organisées entre elles, à l'échelle macroscopique (Figure 47 B).

Quand, dans ces simulations, nous avons à nouveau brisé la symétrie du processus de réaction-diffusion en imposant une différence de vitesse de réaction entre les deux axes ($D_y > D_x$), nous avons à nouveau pu observer, comme nous nous y attendions, l'apparition d'une morphologie striée macroscopique (Figure 47 C). Des simulations ont été faites pour différentes valeurs du ratio de ces constantes de diffusion, $\alpha = D_y / D_x$, variant de 1.0 à 10^4 . Les morphologies striées sont clairement visibles pour un ratio de 1.3. Quand α augmente, la séparation entre les stries diminue et les structures auto-organisées apparaissent plus rapidement.

Pour établir si la brisure de symétrie doit se faire durant toute la période de l'auto-organisation ou seulement durant un court instant, des simulations ont été faites avec une diffusion asymétrique durant les 10 premières minutes du processus seulement. Durant ce laps de temps, la cinétique a eu le temps de faire un 'overshoot' et le système doit avoir bifurqué. Après 10 minutes, nous avons remis les vitesses de diffusion, selon les axes x et y, à valeur égale. Dans ce cas, l'auto-organisation se fait aussi bien que lorsqu'on applique une diffusion anisotrope durant tout le processus d'auto-organisation. Le biais directionnel permettant de briser la symétrie d'orientation des microtubules, orientation initialement isotrope, n'a besoin d'être appliqué que durant un court instant, notamment quand la solution est instable, c'est-à-dire au moment de 'l'overshoot'. C'est à ce moment que la réactivité des microtubules est la plus propice pour répondre à une brisure de symétrie.

Ces simulations permettent de donner un aperçu sur la façon dont la gravité agit sur un système expérimental. Si l'on s'en réfère à Kondepudi et Prigogine [Kondepudi and Prigogine

1981, Kondepudi 1982, Kondepudi and Prigogine 1983], dans un système de réaction-diffusion adapté, la présence d'un champ de gravité de $1g$ au point d'instabilité du système, favorise la formation d'un motif macroscopique. Dans cette approche théorique, la gravité va faire bifurquer le système et va sélectionner une morphologie macroscopique parmi plusieurs morphologies possibles obtenues par des processus de réaction-diffusion. Dans un système de grandes dimensions, en l'absence de la gravité, les différentes petites zones, dans lesquelles se fait une certaine auto-organisation locale, restent non corrélées. L'arrangement global de ces zones correspond dans ce cas à un état macroscopiquement non ordonné. Leur orientation moyenne est isotrope. Si la gravité favorise une orientation spécifique, alors, l'orientation, une fois moyennée, n'est plus isotrope et il en résulte un ordre macroscopique global.

La gravité est impliquée dans le processus de réaction-diffusion de la manière suivante. Au point d'instabilité du processus de réaction-diffusion peuvent apparaître des fluctuations de densité dans le milieu réactif. Les différences de densité sont telles que leur interaction avec la gravité donne lieu, en plus de la diffusion moléculaire, à un processus de transport supplémentaire. C'est un terme de dérive directionnelle qui s'applique selon la direction de la gravité et qui est linéairement proportionnel à la différence de densité. La résultante est un transport plus rapide dans la direction verticale que dans la direction horizontale. Dans un processus dans lequel l'orientation du transport des réactifs est déterminante, cela peut rompre la symétrie de la réaction et favoriser l'apparition d'un motif macroscopique.

Dans les simulations numériques d'auto-organisation des microtubules, il était impossible pour plusieurs raisons d'incorporer spécifiquement une simulation du champ de gravitation et la dérive directionnelle des microtubules (micro sédimentation) qu'elle produit. La raison majeure est que le nombre de calculs nécessaires pour le transport directionnel d'objets nombreux comme les microtubules, est hors de portée de la puissance de calcul pourtant élevée dont nous disposons. Cependant, une situation comparable peut être obtenue lorsque la diffusion de la tubuline est anisotrope. Comme nous l'avons déjà décrit une telle anisotropie donne naissance à un ordonnancement macroscopique de domaines microscopiques initialement non corrélés entre eux. Ce comportement est qualitativement en accord avec la description théorique précédente.

Dans les préparations de microtubules, l'interaction de la gravité avec les fluctuations de densité induit un transport de matière plus rapide dans la direction verticale que dans la direction horizontale. Cela résulte en une légère préférence dans la direction de croissance des microtubules et provoque leur auto-organisation globale. Un examen rapproché

d'échantillons, formés *in vitro* dans des conditions de gravité réduite, montre que de petites régions isolées, d'ordre partiel, subsistent; cela se traduit par de petites taches très légèrement biréfringentes clairsemées dans l'échantillon et ne présentant aucune corrélation d'orientation entre elles. Cette observation est cohérente avec ce que nous avons décrit précédemment. Inversement, des expériences faites dans un champ gravitationnel augmenté par centrifugation (3 à 200 g) montrent une diminution de séparation des stries et une augmentation de la vitesse d'auto-organisation avec l'augmentation de la valeur du champ. Augmenter la force centrifuge est équivalent à augmenter la dérive directionnelle des microtubules dans le processus de réaction-diffusion. En admettant que nous pouvons effectivement rapprocher cela d'une augmentation de l'anisotropie dans le transport de la tubuline, comme nous l'avons fait dans les simulations en brisant l'isotropie spatiale de la diffusion, alors ces résultats sont cohérents avec les prédictions des simulations numériques.

3.3.2. Champs magnétiques et cisaillement

Les observations expérimentales faites en champs magnétiques ont montré que les microtubules s'orientent dans le champ au cours de leur nucléation et au début de leur croissance. Cela est possible parce que le champ magnétique intense produit un couple magnétique qui réoriente les microtubules dans l'axe des lignes de champ. Pour provoquer une auto-organisation due au champ magnétique, il suffit d'exposer les microtubules au début de la réaction. Une fois orientés préférentiellement dans l'axe du champ et après que le champ ait été coupé, les microtubules se réorganisent progressivement par les processus de réaction-diffusion que nous avons décrit.

Une autre observation est qu'en cisillant une solution de microtubules assemblés mais qui ne s'est pas auto-organisée, on provoque une auto-organisation partielle des microtubules, s'étendant depuis la ligne de cisaillement. Dans ce cas, les microtubules ont été mécaniquement orientés dans une direction préférentielle à cause du cisaillement et ils se sont peu à peu réorganisés entre eux pour former une structure microtubulaire auto-organisée.

Il est facile de simuler ce type de rupture de symétrie. Nous avons donc vérifié qu'en orientant préférentiellement quelques microtubules au début du processus, on parvenait à obtenir l'auto-organisation progressive de tout l'échantillon. Dans ces simulations, la diffusion de la tubuline était isotrope dans toutes les directions de l'espace, donc, sans autres sources de rupture de la symétrie, le système ne s'auto-organise macroscopiquement. Durant les premières minutes de la simulation, les microtubules étaient nucléés avec une orientation

unique, c'est-à-dire qu'ils étaient alignés selon l'axe vertical. Cette orientation durant la phase de nucléation, simule l'effet du champ magnétique qui oriente les microtubules selon l'axe vertical du champ, au moment de leur nucléation. Une fois nucléés, les microtubules étaient libres d'évoluer librement dans l'environnement, sans contrainte d'orientation préférentielle, comme c'est le cas dans les simulations habituelles. Nous avons alors observé la formation de morphologies macroscopiques striées différant peu des morphologies obtenues avec une diffusion asymétrique : après 1 minute d'exposition au champ (en simulation plusieurs microtubules ont déjà eu le temps d'être nucléés en 1 minute), l'auto-organisation débute et des stries apparaissent. A la fin du processus d'auto-organisation, le grand axe des stries qui se sont formées correspond à l'axe horizontal de l'échantillon, c'est-à-dire que le grand axe des stries est perpendiculaire à l'axe du champ (Figure 48).

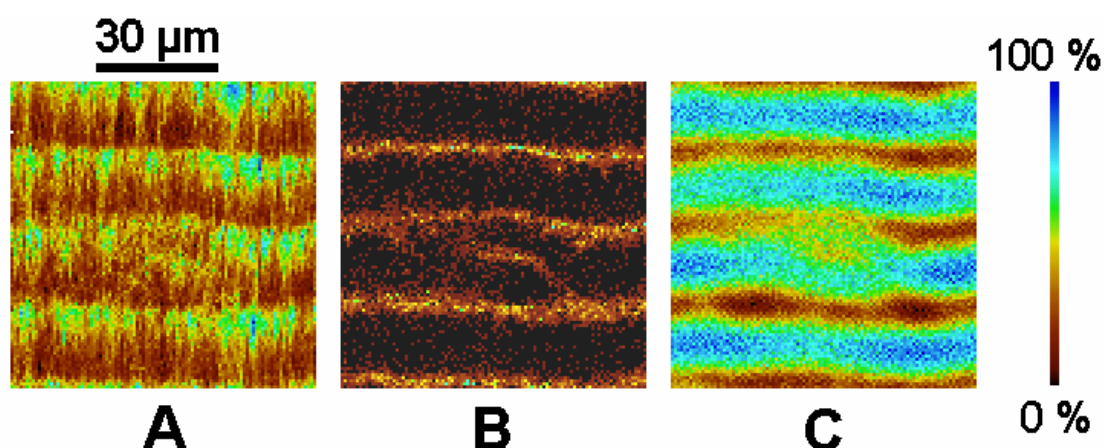


Figure 48. Simulation de l'effet d'un champ magnétique sur le processus d'auto-organisation. Pour simuler un champ magnétique, nous avons imposé durant 1 minute une direction initiale pour les microtubules tout juste nucléés selon l'axe vertical. Aucun autre effet n'était appliqué. Au bout d'une heure de temps de réaction, la morphologie obtenue présente des stries microtubulaires horizontales (A) dans lesquelles les microtubules sont tous parallèles entre eux, perpendiculaires au grand axe des stries, et alignés selon un même front, comme le montre le marquage aux extrémités positives (B). En (C), le motif complémentaire de tubuline-GTP.

Enfin, nous montrons que si l'on applique ce même champ mais plusieurs minutes seulement après le début de la réaction, c'est-à-dire une fois que les microtubules sont bien formés, on ne parvient pas à induire l'auto-organisation.

Ces résultats confirment ce que nous pensions sur le mécanisme d'action du champ magnétique : le champ provoque une orientation préférentielle des microtubules quand ils

sont encore de petite taille. Les microtubules pré-alignés se réorientent ensuite peu à peu pour donner lieu à des structures striées globalement auto-organisées. Le champ magnétique n'a pas besoin d'être appliqué sur une longue durée puisque la rupture de symétrie qu'il produit passe par l'intermédiaire des microtubules tout juste nucléés.

3.4. Autres sources de rupture de symétrie : application à des problèmes biologiques

En plus des champs externes, d'autres facteurs peuvent rompre la symétrie du système et l'amener à l'auto-organisation. Ces facteurs pourraient intervenir dans le contrôle de l'organisation interne du cytosquelette dans les cellules. Nous pouvons simuler l'effet de quelques-uns de ces facteurs. Même s'il est difficile d'apporter des éléments de preuve pour étayer les hypothèses faites quant à l'existence de tels facteurs, les résultats obtenus dans une telle étude apportent des renseignements supplémentaires sur l'ensemble des processus impliqués dans l'auto-organisation des microtubules.

Contrairement aux champs externes faibles, les facteurs auxquels nous allons maintenant nous intéresser font partie intégrante des caractéristiques du système réactionnel lui-même. Nous en présentons ici deux aspects différents : tout d'abord l'effet produit par la géométrie du système, c'est-à-dire la présence de parois imperméables ou d'obstacles et les dimensions du système réactionnel ; ensuite la présence d'un centre organisateur dont l'effet est d'affecter la symétrie réactionnelle du système.

3.4.1. Effet des parois et forme de l'échantillon.

Nous l'avons vu, au niveau des parois imperméables de l'espace de réaction, les microtubules se comportent différemment qu'ailleurs dans l'environnement (cf. 2^{ème} Section de ce Chapitre). Quand un microtubule arrive au niveau d'une paroi, deux évènements peuvent se produire. Dans un premier cas, le microtubule 'sent' chimiquement à distance la présence de la paroi et dévie suffisamment de sa trajectoire pour repartir dans une direction en s'éloignant. Un autre cas qui peut se présenter est que le microtubule ne peut suffisamment dévier et entre en contact avec la paroi. Son assemblage est stoppé, l'extrémité devient instable et le microtubule subit alors un fort désassemblage à partir de cette extrémité. La tubuline-GDP rejetée lors du désassemblage est régénérée en tubuline-GTP. Cette dernière va permettre la nucléation de nouveaux microtubules qui auront globalement tendance à

s'éloigner de la paroi. Le cas échéant, ils subiront le même sort que le microtubule précédent. Les parois sont donc des zones qui induisent une rupture de la symétrie d'orientation des microtubules.

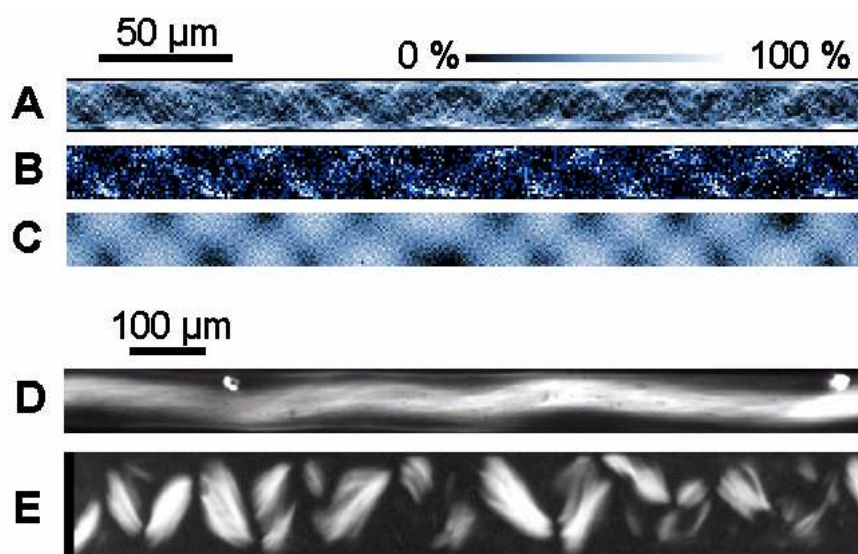


Figure 49. Simulation de l'auto-organisation des microtubules dans un tube de $300 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. Cette simulation met en avant l'effet des parois dans le processus d'auto-organisation, en l'absence de biais directionnel externe. Dans cette simulation, les parois supérieures et inférieures sont imperméables et les parois de droite et de gauche sont reliées entre elles. En (A), le motif microtubulaire montre une morphologie périodique en forme de sinusoïde: les microtubules changent périodiquement de position, passant alternativement d'une paroi à l'autre du tube. Pour une meilleure visualisation du motif simulé, les extrémités des microtubules (B) et le motif de tubuline-GTP (C) sont montrés. Ainsi, on distingue mieux ce motif particulier. La photographie (D) prise en biréfringence montre un motif semblable obtenu par auto-organisation des microtubules dans un canal hémicylindrique de $70 \mu\text{m}$ de large, moulé dans un polymère inerte. Enfin, la photographie (E) prise également en biréfringence, montre une structure de même type dans un capillaire en verre de $100 \mu\text{m}$ de diamètre.

Lorsqu'on lance une simulation dans un environnement réactionnel limité par des parois imperméables, on voit qu'une organisation partielle se fait à leur niveau. Lorsque cet environnement est de grandes dimensions (ex : $400 \times 400 \mu\text{m}$), l'organisation partielle reste cantonnée au niveau des parois et ne gagne pas le reste de l'échantillon, quand celui-ci ne subit pas l'influence d'autres perturbations externes. En revanche, quand l'environnement réactionnel est de faibles dimensions, symétrique (carré ou disque de quelques dizaines de μm de large seulement) ou asymétrique (ex : tube rectangulaire de $300 \mu\text{m}$ de long pour $20 \mu\text{m}$ de large), une certaine auto-organisation peut se faire dans tout l'échantillon (Figure 49).

Ceci est observé expérimentalement : les formes et dimensions des échantillons conditionnent le déclenchement de l'auto-organisation ainsi que les morphologies qui se forment. L'auto-organisation peut être déclenchée dans une solution mise à assembler en apesanteur par le simple fait de la forme et des dimensions de son conteneur (cf. 1^{ère} Partie, 2^{ème} Chapitre, section A.1.3.1).

3.4.2. Effet d'un centre organisateur

Dans les cellules vivantes, les microtubules ont souvent une disposition radiaire avec, les extrémités négatives situées au centre organisateur de la cellule, et les extrémités positives à la périphérie. On peut diviser ces microtubules en deux groupes : les microtubules attachés au centre organisateur, dont les extrémités négatives sont fixées au centriole, et les microtubules libres. Seuls quelques microtubules sont fixés au centre organisateur, les autres, qui s'organisent autour, restent libres et entretiennent la disposition radiaire du réseau de microtubules par un mécanisme de 'turn-over' permanent. Les microtubules sont nucléés au niveau du centre organisateur et se dirigent par treadmilling vers la périphérie de la cellule. Au fur et à mesure qu'ils s'éloignent du centre, ils sont remplacés par de nouveaux microtubules qui les suivent à la trace [Keating and Borisy 1999, Vorobjev et al 1999]. Un autre aspect est que, dans les cellules vivantes, la tubuline est synthétisée, puis libérée, au niveau du réticulum endoplasmique, c'est-à-dire en un point plutôt central dans la cellule. En ces points de synthèse, la concentration en tubuline doit être plus élevée qu'ailleurs dans la cellule. A partir de ces points de synthèse, la tubuline libre diffuse dans le reste de la cellule. Il est probable que la présence d'un gradient de concentration en tubuline dans les cellules ait une influence dans cette organisation du réseau microtubulaire interne.

Dans les simulations, nous pouvons dans une certaine mesure simuler à la fois l'effet de tels points de synthèse et l'effet d'un centre organisateur comme un centriole sur l'auto-organisation de microtubules aux deux extrémités libres. Notons que c'est cela que visait à montrer le modèle de C. Robert et al [Robert et al 1990]. Avec notre modèle plus réaliste nous obtenons au moins les mêmes résultats.

3.4.2.a. Injection de tubuline

Dans les simulations, il est facile de simuler l'injection d'une petite quantité de tubuline en un point de l'espace. Pour cela, on modifie la valeur de la concentration en

tubuline-GTP en un des points de la grille représentant l'espace réactionnel. Avant de lancer la simulation, nous avons donc déposé une certaine quantité de tubuline, en un seul point situé au centre géométrique de la grille. Aucun champ externe simulé n'a été appliqué durant toute la simulation. Rapidement, la tubuline s'est mise à diffuser à partir de ce point vers la périphérie de l'environnement réactif. Peu de temps après le début de la réaction, nous avons vu se former des microtubules qui se sont peu à peu dirigés depuis ce point vers la périphérie. Ces microtubules étaient répartis de façon radiaire autour de ce point et s'en éloignaient avec leurs extrémités positives disposées selon un front de croissance régulier. Ceci s'explique facilement : des microtubules nucléés à partir d'un seul point ne peuvent que s'en éloigner. Cependant, la configuration de la population permettant à un maximum d'individus de se développer est radiaire car, dans ce cas, les extrémités croissantes ne se gênent pas et s'éloignent progressivement les unes des autres.

Alors que la vague de microtubules s'éloignait du centre vers la périphérie, d'autres microtubules nouvellement nucléés au centre ont formé une nouvelle vague. Ceci s'est répété 4 fois (4 vagues), le système tombant peu à peu à cours de tubuline-GTP (Figure 50).

Un point de production de la tubuline est donc un excellent moyen de rompre la symétrie du processus de réaction-diffusion : au lieu de s'auto-organiser à partir d'une solution initialement uniforme de tubuline, l'auto-organisation se fait dans un milieu réactionnel dont la symétrie est rompue par le simple fait d'un gradient de tubuline. La succession périodique de vagues de microtubules simulés depuis le centre vers la périphérie n'est pas sans rappeler le turn-over du réseau de microtubules depuis le centre des cellules vivantes vers leur périphérie. Un exemple comparable est celui de l'amibe *Dictyostelium discoideum* : on peut déclencher son auto-organisation autour d'une zone ponctuelle en injectant une petite quantité d'AMPc en un point d'une population d'amibes, tout juste mises en manque de nourriture. Dans ce cas, des vagues concentriques d'amibes se dessinent autour de ce point. L'existence de régions centrales concentrées en tubuline dans les cellules et les processus d'auto-organisation des microtubules par réaction-diffusion, pourraient constituer un moyen simple d'organiser le cytosquelette de tubuline.

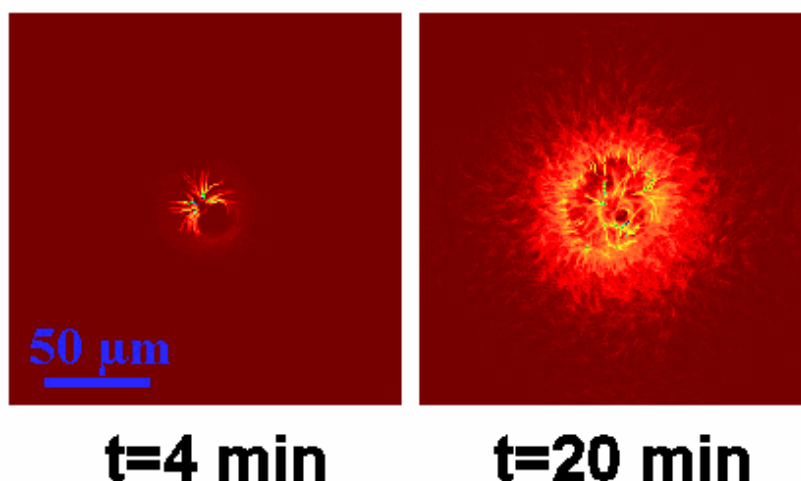


Figure 50. *Auto-organisation des microtubules autour d'une source ponctuelle de tubuline-GTP. Durant 1 minute, nous avons ajouté dans l'environnement initialement vide de tubuline, de la tubuline-GTP en un point central carré de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$, et ce, à raison d'une augmentation de la concentration dans ce carré, de $4\ \text{mg/ml}$ toutes les 0.01 secondes. Rapidement, un nombre important de microtubules est apparu en ce point. Les microtubules se sont alors allongés. La tubuline libre s'est mise à diffuser. La seule direction vers laquelle pouvaient se diriger les microtubules en croissance était la périphérie du point. On peut donc observer très rapidement la formation d'une structure en forme d'aster ($t=4$ minutes). Ensuite, au fur et à mesure que la tubuline diffuse, les microtubules continuent de s'allonger en direction de la périphérie. On voit alors se former des vagues successives s'éloignant radialement du centre vers la périphérie. A 20 minutes, on voit un cercle de microtubules d'environ $50\ \mu\text{m}$ de diamètre entourant un deuxième cercle plus petit d'environ $20\ \mu\text{m}$ de diamètre; il s'agit de deux vagues successives de microtubules.*

3.4.2.b. Centriole simulé

Moyennant quelques additions simples à notre modèle, il nous est également possible de simuler, non seulement l'auto-organisation des microtubules à partir d'un centriole, mais encore l'auto-organisation des microtubules libres dans un espace réactionnel contenant un centriole.

Simuler un centriole est une chose simple. Il suffit de disposer en un même point, fixe dans l'environnement, un certain nombre de microtubules parallèles entre eux, dont toutes les extrémités positives pointent dans la même direction et dont on empêche toute réactivité au niveau des extrémités négatives. Les centrioles que nous avons simulés comportaient 54 microtubules (nombre de microtubules présents dans deux centrioles) dont la longueur initiale

était arbitrairement fixée à 1 μm . Le centriole était disposé au centre géométrique d'un environnement discoïdal, donc ayant schématiquement la forme arrondie d'une cellule vivante (Figure 51).

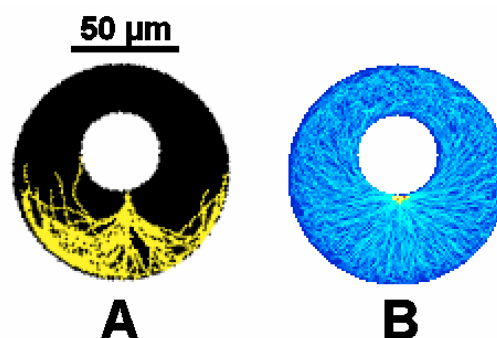


Figure 51. *Auto-organisation des microtubules libres autour d'un centriole simulé. Des simulations ont été faites pour simuler l'auto-organisation des microtubules d'un centriole et des microtubules péricentriolaires dans un environnement représentant schématiquement une cellule vivante avec son noyau. La base du centriole se situe juste en dessous du noyau. Les 54 microtubules du centriole, fixés à leur extrémité négative s'auto-organisent comme ils le font dans la cellule (A), c'est-à-dire qu'ils se dirigent vers la périphérie et forment une cage autour du noyau. Quand on permet à d'autres microtubules de se former librement, ceux-ci s'auto-organisent selon le biais organisationnel dicté par l'organisation du centriole (B)*

Dans ces simulations, nous pouvons regarder le comportement isolé du centriole, en l'absence d'autres microtubules, ou bien autoriser la nucléation de microtubules libres, structurellement indépendants du centriole, à partir de la tubuline libre. Dans ce cas, on peut suivre en même temps le comportement des microtubules du centriole et celui des microtubules libres.

Si l'on étudie uniquement le développement des microtubules du centriole, qu'il y ait ou non des microtubules libres dans le milieu, on observe la formation d'une structure en 'araignée', disposition qui ressemble beaucoup à celle du réseau centriolaire de microtubules dans les cellules (Figure 51 A). Ceci n'est pas une surprise, le modèle de C. Robert et al le prévoyait déjà. Ce phénomène est lié au fait que les microtubules évitent les parois tout en recherchant une disposition radiaire pour optimiser la réactivité de chacun des individus de la population.

Lorsque la libre nucléation des microtubules est permise, une deuxième population de microtubules apparaît et évolue librement dans l'environnement. Ces microtubules pourraient ignorer purement et simplement la présence des microtubules du centriole et s'auto-organiser

indépendamment à leur guise. Ce n'est pas le cas. On observe que les microtubules libres vont progressivement s'auto-organiser autour des microtubules du centriole selon la même morphologie en 'araignée' (Figure 51 B). Cela signifie que les microtubules du centriole ont communiqué un plan de la disposition à adopter aux microtubules libre. Comme la possibilité d'interactions dues à des forces électrostatiques ou dues à la poussée mécanique des microtubules sur d'autres microtubules, n'existe pas dans notre modèle, l'origine de ce phénomène est donc purement liée dans nos simulations au processus de réaction-diffusion. L'orientation préférentielle de quelques microtubules suffit à organiser la population toute entière selon les processus que nous avons précédemment décrit. Dans ce cas, ce sont les microtubules du centriole qui ont joué ce rôle. Ils ont servi de guides chimiques aux autres microtubules.

Dans les cellules vivantes, les centrioles en tant que centres organisateurs pourraient bien jouer ce rôle sur le reste du cytosquelette microtubulaire par les mêmes processus que ceux que nous avons pu simuler.

Chapitre 3 - Discussions sur le modèle d'auto-organisation proposé

Il est intéressant et de rigueur de faire maintenant une rapide analyse des points critiques de notre travail, ceux qui pourraient susciter des interrogations et des discussions animées. Les points concernant la justification expérimentale de l'auto-organisation des microtubules par des processus de réaction-diffusion sont très nombreux. Nous les avons déjà amplement détaillés dans la partie introductive. Nous allons donc plutôt nous attarder sur le modèle d'auto-organisation proposé.

Tout d'abord, à quoi s'apparente notre modèle ? Est-ce un modèle classique de réaction-diffusion tel que Turing le décrit ? Il est indéniable que, vu dans sa globalité, c'est un système de réaction-diffusion générant des structures de type Turing, cependant, il y a des différences au niveau du mécanisme moléculaire.

Une première différence se fait au niveau du nombre de composants. Comme dans le modèle de Turing, c'est le couplage de 'molécules' activatrices et de 'molécules' inhibitrices par des réactions chimiques non linéaires et de la diffusion moléculaire qui permet l'émergence de l'ordre et de formes dans les solutions de microtubules. Dans le système originel de Turing, il y a deux composants réactifs, A et B. Dans le cas des microtubules, il y en a davantage. Pour simplifier, contentons nous des espèces réactives utilisées dans le modèle. Les molécules activatrices sont, sans aucun doute, les complexes tubuline-GTP, et les molécules inhibitrices, les complexes tubuline-GDP. Les microtubules, eux, sont les deux à la fois puisque ce sont eux qui modifient dans l'environnement les concentrations locales en activateur et en inhibiteur. Dans la réalité, il y a un plus grand nombre d'espèces réactives, en particulier le GTP et le GDP libres, mais aussi toute une série d'intermédiaires réactionnels dans le cycle de la tubuline, qui peuvent mobiliser de la tubuline et induire des délais dans les réactions. Dans la littérature, de nombreux intermédiaires réactionnels ont été mis en évidence: oligomères de tubuline-GDP, des anneaux de tubuline (les 'microtubule rings') ...

La deuxième différence essentielle est liée à la nature des composants réactifs. L'anisotropie de forme des microtubules donne à ce système des propriétés supplémentaires par rapport à un modèle spatio-temporel 'classique' de réaction-diffusion. Si l'on ne considère pas l'effet asymétrique de la gravité, dans un système de réaction-diffusion 'classique', la

propagation de l'information à l'origine de la génération d'ordre est unique et isotrope. Dans ce cas, la propagation de l'information d'ordre est due à la diffusion moléculaire qui, en général, est uniforme dans toutes les directions de l'espace. Dans les solutions de microtubules, il y a cette fois deux modes différents de propagation de l'information. Bien sûr, il y a toujours la diffusion moléculaire classique, c'est-à-dire la diffusion des molécules de tubuline libre. En plus de cela, les microtubules, en eux-mêmes, constituent un mode de transport de l'information. Chaque microtubule est un vecteur d'information anisotrope car il modifie l'environnement de tubuline uniquement sur sa trajectoire filiforme. Le modèle de Turing nécessite que les différents protagonistes du système diffusent à des vitesses différentes. Ce n'est pas le cas en ce qui concerne les molécules de tubuline-GTP et de tubuline-GDP: elles diffusent à la même vitesse. Dans notre système, ce sont donc les microtubules qui se chargent d'introduire cette différence grâce à leur polarité structurale et réactive. Des simulations numériques dans lesquelles les microtubules ne comportent que deux extrémités positives ou que deux extrémités négatives (mêmes paramètres réactifs à leurs deux extrémités) ne permettent pas l'émergence d'ordre et de formes.

Il y a une question primordiale que l'on peut se poser : quel est le crédit que l'on peut accorder à une telle hypothèse, c'est-à-dire au fait que les microtubules communiquent et s'auto-organisent entre eux grâce à des traînées de réactifs chimiques ? Après tout, ces rails chimiques n'ont jamais été observés et ne le seront probablement jamais, au vu des difficultés techniques d'une telle opération. Il est évident et logique qu'ils existent car on sait très bien que les microtubules, en se désassemblant, vont laisser localement de la tubuline libre. La question est davantage de savoir si ces traînées chimiques sont exploitées par les autres microtubules comme nous le pensons.

Tout d'abord, on le remarque, c'est un modèle qui peut s'apparenter aux modèles d'auto-organisation des colonies d'animaux tels que les fourmis. Comme les fourmis, les microtubules libèrent des traînées chimiques. Ils remontent ces traînées actives concentrées en tubuline-GTP ou évitent les zones inactives fortement déplétées en tubuline-GTP comme le feraient des fourmis avec des traînées de phéromones activatrices ou inhibitrices. Bien que dans un cas il s'agisse d'organismes vivants et dans l'autre de macromolécules, d'une façon générale, c'est une manière de générer de l'ordre et des morphologies dans les systèmes collectifs.

En outre, les observations expérimentales étayaient cette affirmation. Mandelkow et al [Mandelkow et al 1989] ont fait une observation particulière dans une solution de

microtubules dont la concentration oscillait dans le temps: le réseau de microtubules possédait une sorte de mémoire de la disposition des microtubules dans le temps. En observant le réseau de microtubules à fort grossissement, ils sont quasiment parvenus à distinguer les microtubules à un niveau individuel, ou tout du moins des groupements de microtubules, et ils ont suivi l'évolution dans le temps de ces microtubules. Comme ils s'y attendaient, ils ont pu suivre les oscillations temporelles de la concentration en microtubules à l'échelle microscopique, tandis qu'ils la mesuraient, en même temps, à l'échelle macroscopique, par densité optique. Cela se traduisait par un réseau dense de microtubules durant les phases où la densité optique, donc la concentration globale de microtubule, était élevée, et inversement par un réseau d'une densité fortement atténuée lorsque la concentration globale en microtubule était faible. Ce faisant, la particularité qu'ils ont remarquée, c'est que l'aspect du réseau, c'est-à-dire la disposition des microtubules dans la zone observée, était quasiment identique d'une phase de forte concentration à l'autre, et ce, malgré les périodes de désassemblage intense ponctuant l'observation. Cela ne signifiait qu'une seule chose : des microtubules s'étaient reformés dans les traces de ceux qui venaient d'être détruits par le désassemblage intense.

Une autre observation intéressante a été faite *in vivo* concernant le comportement des microtubules libres [Keating and Borisy 1999, Vorobjev et al 1999]. Dans les cellules vivantes, les microtubules libres (ceux qui ne sont pas fixés au centriole) s'organisent autour du centriole. Certains sont formés par nucléation spontanée, d'autres proviennent de microtubules liés au centriole qui ont été brisés. Dans tous les cas, ces microtubules se déplacent depuis la région péricentriolaire jusque vers la périphérie de la cellule, selon un turnover permanent : lorsque les microtubules s'éloignent de la région péricentriolaire, ils sont remplacés par d'autres qui les suivent à la trace, et ainsi de suite.

Nous-mêmes avons fait une observation intéressante *in vitro* allant dans ce sens. Nous avons mis à assembler à 35°C, 1 µl de solution de tubuline à 10 mg.ml⁻¹ et 2 mM de GTP entre une lame de microscope et une lamelle. L'épaisseur de l'échantillon ne dépassait pas quelques micromètres. Nous avons suivi l'assemblage des microtubules en DIC avec un objectif 100x (ceci peut aussi être fait en fluorescence). Rapidement nous avons pu observer l'apparition de petites structures fibrillaires réparties uniformément dans la solution. La formation des microtubules aurait pu continuer de façon isotrope et uniforme; on aurait dans ce cas obtenu un réseau dense sans aucune organisation. Il n'en était rien. Progressivement certaines zones se sont renforcées prenant un aspect de faisceaux de fibrilles dénotant un certain ordre local. Ceci indique qu'un processus a permis aux microtubules de s'aligner entre eux. L'alignement par des interactions statiques est très peu probable; des observations en

microscopie électronique révèlent que les microtubules, s'ils sont alignés, ne sont pas en contact direct et sont même suffisamment éloignés entre eux pour éviter ce phénomène. De plus, la forte salinité du tampon devrait amplement suffire à écranter les interactions de type électrostatique.

Enfin, les expériences faites en champs magnétiques intenses et les expériences de cisaillement vont aussi complètement dans ce sens. Rappelons que les champs magnétiques, comme les effets de cisaillement, ne rompent la symétrie dans la solution qu'en agissant au niveau individuel, c'est-à-dire en orientant préférentiellement les microtubules. C'est à partir de ce moment seulement que, dans ce cas, les microtubules se réorganisent en structures complexes. L'hypothèse d'auto-organisation par ces traînées de tubuline prévoit ce cas de figure. Les microtubules communiquent entre eux et peuvent s'auto-organiser localement grâce aux traînées chimiques, mais, c'est lorsqu'on oriente préférentiellement quelques microtubules dans l'ensemble de la population que l'auto-organisation peut se faire à un niveau macroscopique, par toute une série de réarrangements faisant intervenir leur désassemblage et leur réassemblage [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000]. Ce ne serait pas le cas s'il s'agissait d'une organisation par des interactions statiques: des molécules préorientées ne se réarrangeraient pas en structures macroscopiquement auto-organisées; elles resteraient orientées de la même manière.

Toutes ces observations constituent des éléments de preuve qui étayent notre hypothèse. En attendant de trouver mieux, c'est avec un tel mécanisme que l'on peut obtenir en simulation des morphologies auto-organisées comparables à ce que l'on peut observer expérimentalement.

Un autre point essentiel dont on peut discuter concerne le choix des paramètres et leur fiabilité. Nous l'avons déjà dit, les observations concernant le comportement des microtubules individuels sont très variables, et les modèles qui ont été faits sont souvent contradictoires. Il est donc difficile d'élaborer un modèle en se fondant uniquement sur ce que l'on peut lire dans la littérature. Faire ceci, ce serait un peu comme essayer d'écrire la recette d'un gâteau compliqué à faire, juste en observant et en goûtant le gâteau. Mais on peut toutefois se faire une idée du type de recette qui a servi et de certains ingrédients. C'est ce que nous avons fait afin de reproduire non pas des comportements parfaits, mais un ensemble de comportements caractéristiques (treadmilling, instabilité dynamique). Des équations génériques ont été utilisées et les paramètres ont été choisis pour que les comportements obtenus soient les

meilleurs possibles. Ils sont encore loin de l'être, mais le modèle fonctionne quand même de façon satisfaisante.

Le processus fondamental de l'auto-organisation telle que nous l'avons décrite, c'est-à-dire la formation des traînées chimiques, ne dépend que très peu de la perfection des paramètres. En effet, ce qui compte avant tout c'est d'obtenir du treadmilling et une réponse non linéaire en fonction des concentrations en tubuline-GTP et en tubuline-GDP. D'ailleurs, dans les premiers modèles que nous avons faits les paramètres étaient plutôt arbitraires, et les microtubules étaient plus simples, car ils ne pouvaient croître que d'une extrémité et décroître uniquement de l'autre. Cela n'empêchait pas une certaine forme d'organisation de se faire !

Les valeurs des paramètres vont déterminer si, oui ou non, on peut obtenir de l'auto-organisation, et leur exactitude ainsi que celle du modèle va permettre de se rapprocher plus ou moins des morphologies réalistes qu'on observe. Il semble que l'auto-organisation est un phénomène robuste, puisque, même avec un modèle imparfait et des paramètres cinétiques inexacts, on observe de l'auto-organisation. En simulation, il est d'ailleurs plus difficile d'empêcher à cette auto-organisation élémentaire de se faire que d'en obtenir. *In vitro*, des modifications des paramètres chimiques altèrent l'auto-organisation, mais il faut des changements assez importants pour l'empêcher complètement. Par exemple, 5 mM de magnésium altèrent fortement l'auto-organisation et font disparaître la plupart des structures observées habituellement. Cependant de l'ordre persiste et il en faut des quantités élevées (10 mM) pour arriver à ses fins.

Enfin, un dernier point critiquable concerne la façon dont est simulée la gravité dans notre modèle. Pour cela, nous avons simplifié le problème en faisant en sorte que la diffusion des molécules de tubuline soit plus élevée selon l'axe vertical que celle qui se fait selon l'axe horizontal. Ce choix a été fait pour des raisons de calculabilité. Une vraie simulation de la gravité impliquerait le calcul du transport directionnel de chacun des microtubules et ce, bien entendu, de façon inhomogène dans l'espace. Ce calcul est bien trop lourd.

La gravité agit en induisant la dérive directionnelle de zones denses et ayant une certaine cohésion. Nous l'avons vu, ce sont les microtubules qui sont en très grande majorité à l'origine de ces fluctuations de densité; celles-ci se traduiraient par des petits îlots denses de microtubules, répartis d'une manière initialement homogène, dans une solution moins dense en microtubules. Ceci a été observé expérimentalement par microscopie dans une préparation de faible épaisseur comprise entre lame et lamelle. La gravité agirait en induisant le transport directionnel de ces îlots de microtubules par rapport à la solution de tubuline libre. Cela

reviendrait à dire qu'à un moment donné, quand ces fluctuations sont suffisamment denses pour interagir avec la gravité, on déplacerait très légèrement et dans la direction verticale les microtubules par rapport à leur environnement de tubuline. Dans le modèle, c'est l'inverse que l'on fait: on déplace l'environnement de tubuline par rapport aux microtubules. Ce déplacement peut être fait de deux manières différentes : soit on provoque un décalage régulier et directionnel des grilles de tubuline-GTP et de tubuline-GDP par rapport à la position des microtubules (en ajoutant un terme de flux directionnel dans l'équation de la diffusion), soit on induit une diffusion différentielle de la tubuline selon les deux axes. Les deux solutions fonctionnent, mais pour des raisons pratiques, c'est la deuxième solution, qui n'est pas la plus exacte, qui a été retenue. Ceci dit, si elle n'est pas exacte, elle n'en permet pas moins de suivre le développement des morphologies en fonction d'une rupture de symétrie spatiale, plus ou moins élevée (plus ou moins de différence entre les vitesses de diffusion de la tubuline selon les axes x et y). C'est après tout ce que nous recherchions, et cela nous a permis d'obtenir l'effet escompté.

Notre modèle a des limites, mais il permet en tout cas de reproduire l'essentiel des comportements observés expérimentalement *in vitro* et *in vivo*. Il est normal qu'il ne couvre seulement qu'une partie de la vérité. Souvent, les résultats que fournissent les modèles sont pris pour évangiles sans être remis en question. On peut même se complaire à jouer aux divinités avec un modèle tant il nous semble efficace. On pense avoir un contrôle total sur le petit univers qu'on a créé et décider en maître du devenir de chacun de ses éléments. Mais ce serait se leurrer. Un modèle reste un modèle et ce serait être bien prétentieux que d'assurer que ce modèle est le reflet de la réalité. Il serait vain d'expliquer la nature tout entière avec un simple jeu d'équations différentielles ou toute autre opération mathématique. Sa complexité en fait un être indomptable dont on ne peut qu'en percevoir les parties. Ian Stewart rappelle bien que dans l'histoire, nombreux sont ceux qui, comme Euler, ont cru pouvoir le faire et ont préféré évoquer une connaissance imparfaite des mathématiques pour pardonner leur incapacité à expliquer la nature [Stewart 1989]. Que penser quand on s'aperçoit que l'on ne peut même pas prévoir le comportement collectif d'un petit groupe de robots sociaux que l'on a nous même créés, et dont on connaît la constitution et le mode de fonctionnement individuel exact ? Non, un modèle fourni à celui qui sait recouper ses résultats avec ce qu'il peut obtenir de l'expérimentation, des éléments de réponse sur la façon dont pourrait fonctionner un processus naturel. C'est dans cette optique que notre travail a été réalisé.

CONCLUSIONS

Si les théories concernant la génération d'ordre et de formes par des processus de réaction-diffusion remontent maintenant à une cinquantaine d'années, ce n'est que beaucoup plus tard que ceci a été réellement reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique. Jusqu'en 1990, cela était souvent considéré comme impossible. Il y a douze ans, Castet et al ont prouvé que les structures qui se forment au cours de réactions chimiques du même type que la réaction de Belousov-Zhabotinski étaient dues à des processus de réaction-diffusion, comme Turing l'avait prédit 38 ans plus tôt [Castet et al 1990]. Au même moment, Tabony et Job découvraient le premier exemple biologique *in vitro* s'auto-organisant de la même façon, par des processus dissipatifs [Tabony and Job 1990]. Depuis cette découverte, de nombreuses expériences réalisées dans ce laboratoire ont permis d'accumuler suffisamment d'évidences pour pouvoir affirmer que ces morphologies microtubulaires auto-organisées se forment comme des structures de Turing, par des processus de réaction-diffusion [Tabony et coauteurs]. Durant cette même période, une hypothèse qui permettrait d'expliquer l'auto-organisation des microtubules au niveau moléculaire, a progressivement émergé au cours des discussions de laboratoire, de l'ensemble du savoir accumulé sur le comportement des microtubules dans la littérature et grâce aux expériences qui y ont été réalisées. Cette hypothèse, que nous avons longuement décrite dans le manuscrit, se fonde, rappelons-le, sur l'idée que les microtubules s'auto-organiseraient entre eux à la manière des fourmis en suivant des traînées chimiques laissées par d'autres microtubules. Cependant, à part quelques observations faites dans la littérature et qui seraient en accord avec cette hypothèse (voir le chapitre 3 de la partie précédente), celle-ci ne restait que de la théorie. Voici en résumé où nous en étions au début de ce travail de thèse.

Actuellement, au vu des résultats que nous avons obtenu, nous pouvons affirmer que, sous réserve de trouver mieux, ce mécanisme moléculaire est, de loin, le plus probant. Au niveau microscopique, les microtubules s'auto-organisent en communiquant entre eux grâce à des traînées de métabolites qu'ils produisent eux-mêmes. En plus de cela, l'approche à la fois théorique et expérimentale que nous avons suivi, nous a permis de comprendre comment des champs externes, tels que la gravité ou les champs magnétiques, agissent au niveau microscopique, voire moléculaire, pour déclencher l'auto-organisation à une échelle macroscopique.

L'auto-organisation des microtubules se fait après que la symétrie de la réaction ait été brisée. Dans les expériences au sol, la rupture de symétrie du processus se fait grâce à la

présence de la gravité. Il y a quatre ans, des expériences en apesanteur ont prouvé qu'en l'absence de gravité, les préparations microtubulaires ne s'auto-organisaient pas [Papaseit et al 2000]. Grâce à nos expériences en clinostat et en lévitation magnétique, nous avons pu prouver que l'on peut étudier l'effet des champs externes au sol et se passer d'expériences aussi lourdes de mise en œuvre et coûteuses que des expériences de fusée sonde.

Nos expériences démontrent que des champs externes, autres que la gravité, tels les champs magnétiques ou un champ de vibrations, provoquent une rupture de symétrie au cours du processus réactif et induisent l'auto-organisation. Ceci a pu être montré dans des conditions telles que la gravité n'intervenait pas ou peu, c'est-à-dire dans des conditions d'apesanteur simulée, soit en lévitation magnétique en champs magnétiques intenses, soit dans des clinostats. Les valeurs seuil de champ gravitationnel et de champ magnétique pour lesquelles le système bifurque, ainsi que la fenêtre de temps durant laquelle le système répond à leur action, ont été déterminés. Plus important, certaines expériences ont donné de précieuses indications sur la nature des mécanismes aux fondements de l'auto-organisation. Les champs magnétiques intenses et les phénomènes de cisaillement fournissent une preuve irréfutable sur un des aspects du mécanisme que nous avons décrit. L'orientation préférentielle de quelques microtubules provoque le départ de l'auto-organisation. Une fois la rupture de symétrie du processus de réaction-diffusion enclenchée, les microtubules, grâce à leur forte réactivité, se réorganisent progressivement, notamment par désassemblage et réassemblage [Papaseit 1998, Papaseit et al 1999, Tabony et al 2000], et font peu à peu émerger les structures auto-organisées.

Le processus d'auto-organisation est un phénomène émergent de la dynamique de ce système hors équilibre thermodynamique. Nous avons montré que d'autres phénomènes émergents sont liés à l'auto-organisation des microtubules. Le mouvement ordonné et l'auto-organisation de particules colloïdales micrométriques dans ces solutions de microtubules peut être compris comme une propriété émergente associée à ce processus de réaction-diffusion. En effet, ce phénomène est associé à la réactivité des microtubules et ne se produit pas quand les microtubules ne s'auto-organisent pas. Les mécanismes moléculaires qui permettent le mouvement des particules et leur auto-ordonnement sont difficiles à identifier. Néanmoins, les expériences tendent à confirmer que ce phénomène est dû à la formation d'ondes de concentration en microtubules ou d'ondes de viscosité. Les simulations numériques, en aboutissant à l'émergence de ces ondes de concentration en microtubules, confortent grandement la possibilité d'un tel mécanisme.

Les expériences apportent donc de précieuses informations quant aux mécanismes moléculaires à l'origine de l'auto-organisation, et sur la façon dont les champs externes agissent. Les simulations numériques constituent un poids considérable pour notre compréhension de l'auto-organisation. Le modèle que nous avons élaboré nous a permis une investigation dans le processus d'auto-organisation à tous les niveaux. Fondé sur des processus de réaction et de diffusion, ce modèle, de type automate cellulaire, nous montre comment les microtubules s'auto-organisent entre eux et se comportent comme un ensemble collectif : les microtubules communiquent entre eux à la manière des fourmis, c'est-à-dire en laissant derrière eux des traînées de métabolites qui servent de 'rails chimiques' guidant les autres microtubules. Ainsi, les simulations permettent d'observer *in silico* la formation de faisceaux de microtubules, et surtout de structures macroscopiquement auto-organisées très ressemblantes avec celles que l'on observe *in vitro*. Le modèle prévoit qu'en l'absence de perturbations externes, les microtubules ne s'auto-organisent qu'à un niveau très local, microscopique. L'action de champs externes et autres biais directionnels capables de briser la symétrie de la réaction a été simulée. Les résultats des simulations numériques indiquent, comme cela est prévu par les théories [Nicolis and Prigogine 1989], que la gravité agit par le biais de fluctuations de densité apparaissant à un moment critique d'instabilité chimique, tôt dans le processus d'auto-organisation. De même, des microtubules simulés, dont on force l'orientation initiale, s'auto-organisent dans les simulations numériques; *in vitro*, l'action des champs magnétiques intenses, ou les phénomènes de cisaillement, provoquent l'auto-organisation des solutions de microtubules en induisant l'orientation des microtubules dans une direction préférentielle. Enfin, le modèle conforte les expériences en fournissant un mécanisme potentiel pour expliquer le déplacement et l'auto-ordonnement de particules colloïdales. Dans le modèle, des ondes de concentration apparaissent et se déplacent selon des fronts uniformes; ces ondes de concentration correspondent à des ondes de viscosité. Des particules colloïdales pourraient ainsi être déplacées et regroupées. La vitesse de déplacement de billes de polystyrène dans les solutions de microtubules *in vitro* est d'ailleurs du même ordre que celle des ondes de viscosité obtenues dans les simulations (environ $5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$). Le modèle reproduit donc l'essentiel des comportements observés expérimentalement.

Dans la présentation du manuscrit, la partie expérimentale et la partie modélisation sont séparées pour des raisons de clarté. Au cours de notre étude, ces deux aspects étaient intimement liés. Les nouvelles données des expériences alimentaient le modèle; en fonction de ce qui était observé, nous ajustions le modèle et ses paramètres. Inversement, les résultats

des simulations numériques nous amenaient à réfléchir sur la façon dont se faisait l'auto-organisation; souvent, cela nous suggérait de nouvelles expériences. Par exemple, expérimentalement nous avons cherché à nous rapprocher progressivement des conditions imposées par le modèle, c'est-à-dire les dimensions des échantillons. Nous avons ainsi réalisé des expériences dans des échantillons de taille réduite (microcuvettes, cuves de fine épaisseur, microcapillaires). La combinaison entre les expériences et les simulations numériques nous a donc permis d'approfondir considérablement notre connaissance des phénomènes impliqués.

L'ensemble de ces résultats, obtenus *in vitro* et en simulation, est en accord avec un grand nombre d'observations expérimentales réalisées *in vivo*. Il a été effectivement montré que le cytosquelette se désorganisait dans des cellules vivantes en apesanteur; la conséquence en est une altération des fonctions cellulaires associées [Hughes-Fulford et al 1996, Cogoli-Greuter et al 1998, Lewis et al 1998, Vassy et al 2001]. D'autres champs externes comme les champs magnétiques [Ueno and Iwasaka 1996, Denegre et al 1998] agissent sur les cellules vivantes par le biais des microtubules. En outre, il a été montré que des champs externes différents de la gravité, comme des champs de vibrations, pouvaient compenser les effets néfastes dus à l'exposition de systèmes vivants à l'apesanteur [Eisman 2001, Rubin 2001]. Nos expériences réalisées *in vitro* indiquent que les microtubules, par leurs propriétés d'auto-organisation et leur dépendance vis-à-vis des champs externes faibles, constituent un vecteur privilégié pour transmettre les effets de la gravité, des vibrations ou des champs magnétiques dans les cellules vivantes.

Ce travail suggère un certain nombre d'applications (ex: correction des effets néfastes dus à l'apesanteur), et il soulève des questions, notamment à propos de l'importance de ces processus *in vivo*. Nous l'avons déjà évoqué, ce processus est fondamental car il est intrinsèque aux microtubules et à la façon dont ils communiquent entre eux. Ce phénomène pourrait expliquer bien des choses dans le vivant, notamment de nombreux aspects de la morphogenèse et de l'embryogenèse, faisant intervenir les microtubules, la division cellulaire, le transport ordonné de vésicules dans les cellules ou encore la sensibilité des êtres vivants vis-à-vis des champs externes faibles. Le modèle que nous avons élaboré est ouvert à de telles perspectives. Couplé à des modèles 'classiques' de morphogenèse (ex: motifs génétiques chez la mouche drosophile), il pourrait par exemple expliquer certains aspects comme par exemple la rupture de symétrie de ces systèmes et le rôle des champs externes sur le développement des embryons. En outre, notre modèle pourrait être intégré dans des projets de biologie

théorique plus vastes, constituant une des nombreuses pièces d'un modèle se situant à une échelle de grandeur bien supérieure. Par exemple, notre modèle serait intégré dans le modèle de morphogenèse d'une cellule vivante avec d'autres modèles décrivant d'autres aspects cellulaires (aspects génétiques et synthèse des constituants cellulaires, flux de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, interaction de cette cellule avec l'environnement extérieur...). Et, de la même façon, ce modèle cellulaire ne serait qu'une brique d'un modèle tissulaire; et ainsi de suite sur plusieurs niveaux de grandeur. Dans un tel contexte, les microtubules constitueraient une pièce maîtresse de l'édifice, car ils lui lègueraient l'ensemble des propriétés que nous avons observées à la fois expérimentalement et en simulation, entre autres les propriétés d'auto-organisation et de morphogenèse, et la sensibilité vis-à-vis des champs externes faibles.

Épilogue

J'ai commencé l'écriture de ce manuscrit en citant un homme qui a vu la nature comme peut-être personne ne la verra jamais aussi bien dans son entièreté. Il n'avait pas les moyens techniques d'en connaître les détails les plus intimes comme nous-mêmes en avons la possibilité. Pourtant à forces d'intuitions et de raisonnements logiques, et en traitant les problèmes par analogie sans essayer de les décortiquer et leur enlever ainsi leur substance, il a soulevé de nombreuses questions encore d'actualité et est parvenu à des conclusions phénoménologiques générales qui devraient encore faire figure de référence pour ceux qui s'intéressent aux sciences du vivant. Laissons-lui donc le dernier mot. *"Il est donc évident que nous n'aurons jamais d'idée nette de ces forces pénétrantes, ni de la manière dont elles agissent; mais en même temps il n'est pas moins certain qu'elles existent, que c'est par leur moyen que se produisent la plus grande partie des effets de la nature"*. **Buffon** (g)

ANNEXES

Annexe 1. Préparation des solutions de microtubules

La tubuline utilisée pour préparer les solutions d'assemblage est extraite de cerveaux de bœufs. Elle est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (phosphocellulose). La tubuline obtenue est pure et exempte de protéines associées comme les MAPs et autres moteurs moléculaires. La tubuline purifiée est conservée dans un tampon MEM-D₂O. Le MEM contient du Mes (Acide 2-(N-morpholino) ethane sulfonique) et du magnésium (Mg²⁺) à 1 mM. Le Tampon MEM est couramment utilisé pour l'assemblage des microtubules. Le fait que la solution soit préparée dans l'eau deutériée est lié à l'historique des expériences faites sur l'auto-organisation des microtubules: les conditions réactives nécessaires à l'auto-organisation ont été initialement calibrée dans ce tampon à base d'eau lourde car cela était nécessaire pour effectuer des mesures d'énergie en RMN [Tabony and Job 1990] et de la diffusion de neutrons aux petits angles [Papaseit et al 1999]. L'eau lourde est connue pour favoriser l'assemblage des microtubules *in vitro* et réduire leur instabilité dynamique [Houston et al 1974, Panda et al 2000].

Les solutions de tubuline sont préparées à 4°C pour empêcher la tubuline de s'assembler durant la préparation. Elles sont composées de MEM-D₂O, de tubuline purifiée à une concentration habituelle de 10 mg.ml⁻¹ de tubuline purifiée, et d'un excès de GTP, soit 2 mM de GTP (équivalent à 1 mM de GTP avec un système de régénération constitué d'acétate kinase à 0.83 µg.ml⁻¹ et d'acethyl phosphate à 20 mM).

La solution est vortexée pour bien mélanger les réactifs, puis elle est centrifugée 15 minutes à 3500 RPM pour éliminer d'éventuelles impuretés. Le conteneur est alors rempli puis la solution est dégazée durant 20 minutes à 4°C sous vide (à la limite du point d'ébullition de l'eau) à l'aide d'une pompe à vide ou d'une trompe à vide. Le dégazage de la solution est une étape importante. La solution qui vient d'être préparée contient des bulles d'air qui s'accrochent aux parois de verre des cuves, ainsi qu'une quantité abondante de gaz dissous. Lorsqu'on réchauffe les échantillons à 35°C, les gaz se dilatent et des bulles d'air apparaissent; quant aux petites bulles d'air existantes, leur volume augmente de façon importante. Non seulement la présence de bulles est gênante pour l'obtention de jolies morphologies auto-organisées, les bulles constituant des obstacles dans l'échantillon, mais en plus elles ont tendance à remonter à la surface de la solution (vers le col des cuves) au cours de l'assemblage, se comportant comme de véritables bulldozers face aux microtubules. Dans la mesure du possible, elles doivent donc être éliminées. Une fois le dégazage effectué, les

échantillons sont placés à 35°C soit en chambre chaude, soit dans un porte-échantillons efficace. La vitesse de réchauffement doit être élevée pour obtenir des morphologies correctes. L'obtention d'une morphologie auto-organisée, dans les conditions normales de réaction se fait en 5 heures environ.

Annexe 2. Méthodes optiques

Dans cette annexe sont présentées les différentes méthodes optiques utilisées pour observer les échantillons.

2.1 Polarisation et biréfringence

L'observation en polarisation croisée permet de connaître l'orientation préférentielle d'objets comme les microtubules, dans un échantillon.

Certains objets, dits biréfringents, dévient la lumière et séparent les rayons lumineux en deux rayons partiels dont les directions de vibration sont perpendiculaires entre elles : le rayon ordinaire traverse l'objet en ligne droite et le rayon extraordinaire est décalé latéralement. Les rayons ont des indices de réfraction différents. Leur vitesse de propagation dans l'objet est différente.

Un polariseur est un filtre qui permet d'orienter la lumière dont les directions de vibrations sont isotropes, selon une seule direction de vibration. Cette dernière est donnée par l'axe du polariseur. Si l'on intercale deux polariseurs perpendiculaires entre eux dans l'axe d'un rayon lumineux non polarisé, aucune lumière n'en ressort. Le premier polariseur sélectionne une direction de vibration dans la lumière naturelle. La lumière qui en ressort vibre dans l'axe du premier polariseur. Le deuxième polariseur, dit 'analyseur', polarise lui aussi la lumière qui lui parvient. Il ne sélectionne que les rayons lumineux dont l'une des composantes vibre dans son axe. Lorsque la lumière qui lui parvient est polarisée et vibre perpendiculairement à son axe, cette lumière est 'éteinte' par l'analyseur.

Si l'on intercale entre ces polariseurs un objet biréfringent déviant la lumière dans un axe différent de celui des polariseurs, la lumière polarisée par le premier polariseur est déviée par l'objet et il en ressort une certaine résultante après son passage dans l'analyseur. L'intensité de la lumière transmise dépend de l'orientation de la lumière déviée par l'objet. Elle est maximale quand l'objet dévie la lumière à 45° (ou 135°) par rapport à l'axe des polariseurs.

Lorsque les deux rayons biréfringents (ordinaire et extraordinaire) traversent le polariseur, les deux ondes déphasées sont ramenées dans la direction de l'analyseur : il n'en ressort que leur résultante dans l'axe de ce dernier.

Les microtubules sont des structures particulièrement biréfringentes. Leur anisotropie de forme provoque la déviation de la lumière, en un rayon ordinaire dans l'axe du microtubule et un rayon extraordinaire perpendiculaire à l'axe du microtubule [Heyn 1954]. Ainsi, on peut observer l'orientation résultante des microtubules par lumière polarisée. L'intensité de la lumière dépend en tout point de l'orientation résultante des microtubules (elle est maximale à 45° et à 135°) et du degré d'orientation des microtubules en ce point (il est maximal quand tous les microtubules sont parallèles entre eux et minimale quand l'orientation des microtubules est aléatoire). Les motifs microtubulaires auto-organisés présentent des alternances de bandes sombres et de bandes claires correspondant à des alternances périodiques d'orientation des microtubules. Cependant, cette observation ne permet pas de savoir si les microtubules sont orientés à 45° ou à 135° dans les bandes claires du motif.

L'utilisation d'une lame d'interférence retardatrice permet de lever cette dégénérescence d'orientation. Un compensateur λ , induisant une différence de longueur d'onde de 550 nm (rouge de premier ordre ou mauve), est intercalé entre l'analyseur et l'objet biréfringent, à 45° par rapport au polariseur. Il permet de différencier les deux rayons biréfringents d'un objet déviant la lumière. Cette longueur d'onde d'interférence s'ajoute ou se soustrait à la différence de marche des rayons. Lorsque l'objet est orienté de la même façon que la lame retardatrice, il y a addition et la couleur d'interférence est bleue; quand il est orienté à 90° par rapport à λ , il y a soustraction et la couleur d'interférence est jaune. Si l'objet est dans l'axe du polariseur ou de l'analyseur, donc à 45° par rapport à λ , la couleur d'interférence est celle produite par la lame λ seule, c'est-à-dire mauve. Ainsi, le motif microtubulaire observé présente cette fois des alternances périodiques de bandes bleues et de bandes jaunes séparées à chaque fois par un fin liseré mauve. Ceci correspond à une alternance périodique d'orientation des microtubules à 45° et à 135° .

2.2 Le contraste de phase interférentiel (DIC)

Cette méthode est une alternative aux observations en lumière polarisée car elle permet de visualiser des détails transparents en relief avec un excellent contraste. Cette méthode est tout à fait adaptée pour visualiser des structures fines comme les petites stries et les faisceaux de microtubules.

Le faisceau de lumière est d'abord linéairement polarisé par un polariseur (polariseur de Sernamont), puis il est dédoublé en deux faisceaux partiels par un prisme biréfringent (une lame $\lambda/4$). Les deux faisceaux partiels sont séparés par une faible distance à la sortie du prisme. Ils traversent l'objet de la préparation à observer en deux points proches qui donnent aux deux faisceaux partiels une différence de marche; celle-ci provient des indices de réfraction différents et de l'épaisseur différente de l'objet en ces deux points. À la sortie de l'objet, un prisme biréfringent réunit à nouveau les faisceaux partiels. Les deux ondes déphasées sont ensuite ramenées dans la direction de vibration de l'analyseur. Les différences de marches sont visualisées sous forme de niveaux de gris à la sortie de l'analyseur. Un compensateur λ se charge ensuite de remplacer les niveaux de gris par des couleurs.

2.3 Microscopie fond noir

La microscopie fond noir permet de visualiser les objets qui diffusent la lumière comme les microtubules ou les billes de polystyrène.

À la sortie du condenseur de lumière du microscope est disposée une lame contenant un cache optique obstruant le passage normal de la lumière. C'est un disque noir qui empêche le passage direct de la lumière transmise. Seuls les rayons lumineux qui ne sont pas dans l'axe de lumière du microscope passent. Ces rayons ne parviennent normalement pas à l'objectif. Aucune lumière ne parvient à l'œil de l'observateur qui n'observe donc qu'un fond noir. Si un objet qui diffuse la lumière est intercalé, il va diffuser les rayons lumineux qui sont hors du trajet optique. Les rayons diffusés sont alors transmis dans l'axe de l'objectif et l'objet est observable. Ainsi, on peut observer des objets qui apparaissent lumineux sur un fond noir.

Cette méthode est parfaitement adaptée à l'observation de particules comme les billes de polystyrène qui diffusent la lumière de façon très intense.

2.4 Fluorescence

La fluorescence permet d'observer uniquement des objets marqués par une substance fluorescente. Dans notre cas, nous nous en sommes servi pour observer les microtubules par un marquage au DAPI (bleu), les billes de polystyrène fluorescentes dans le rouge et le milieu liquide de la solution tracé grâce à de la rhodamine (rouge). Le DAPI, 4',6-diamidino-2-phénylindole [Bonne et al 1985], est un marqueur de la tubuline et des microtubules. Cette molécule a la particularité d'être huit fois plus fluorescente lorsqu'elle est fixée à de la

tubuline assemblée sous forme de microtubules. C'est donc un bon marqueur des microtubules.

Le principe de la fluorescence est simple. On excite une molécule fluorescente avec une lumière monochromatique correspondant à la longueur d'excitation de la molécule. La molécule excitée absorbe une partie de l'énergie lumineuse et réémet l'autre partie sous forme de lumière avec une longueur d'onde supérieure (énergie inférieure) que l'on peut observer.

Le DAPI est excité dans l'ultraviolet à 358 nm et réémet dans le bleu à 461 nm. Les filtres Zeiss utilisés pour le DAPI sont un filtre d'excitation Bande passante BP365 et un filtre d'émission 'Low Pass' LP397 avec en plus un filtre d'émission Ealing Bande Passante CW450 (deux filtres d'émission ont été utilisés pour augmenter le contraste des objets vus en fluorescence DAPI). La rhodamine (red) est excitée dans le visible à 570 nm et réémet dans le rouge à 590 nm. Les billes fluorescentes utilisées [Sigma-c] sont excitée à 575 nm et réémettent à 610 nm. Pour la rhodamine et pour les billes fluorescentes, les filtres Zeiss utilisés sont un filtre d'excitation Bande passante BP546 et d'émission 'Low Pass' LP590.

2.5 Instruments optiques

Pour les observations microscopiques nous avons utilisé un microscope Zeiss Axioscop 2 équipé d'un système de polarisation, d'un système fond noir et de filtres de fluorescence Zeiss. Pour les observations de morphologies microtubulaires et les morphologies auto-organisées de particules de polystyrène, nous avons utilisé les objectifs suivants : objectif Zeiss Plan-Neofluar 1.25x/0.035 (NA), objectif Zeiss Plan-Neofluar 2.5x/0.075 (NA), objectif Reichert Plan 4x/0.12 (NA) , objectif Reichert Plan 10x/0.25 (NA), objectif Leitz Wetzlar L20x/0.32 (NA) – UTK 32x/0.50 (NA), objectif Reichert Plan Iris 40x/0.75 (NA), objectif Zeiss Plan-Neofluar 100x/1.30 (NA) Oil Iris. Pour les films du mouvement des particules faits en biréfringence (cf. 1^{ère} Partie, 1^{er} chapitre) nous nous sommes servis d'un microscope polarisant Leitz Wetzlar Ortholux Pol-BK avec un objectif Leitz Wetzlar UM20x/0.33 (NA).

Sous microscope, les photos ont été faites soit avec un appareil photo numérique Nikon Coolpix 990, soit avec des captures digitales faites à partir d'une camera digitale couleur Sony SSC-DC50P ou d'une camera digitale noir et blanc à intégration Sony XC-8500CE équipée d'un intégrateur d'intensité pour rehausser les photographies d'objets peu lumineux.

Les photographies des cuves entières ont été faites pour la plupart avec un montage de biréfringence comprenant une source de lumière froide Zeiss KL1500 avec un filtre correcteur bleu, suivie d'un diffuseur de lumière pour obtenir une lumière homogène, deux polariseurs croisés et une lame λ , et enfin, en bout de chaîne, un appareil photo Minolta X300 équipé d'un objectif 50 mm macro et une bague de macro de 36 mm. Les photographies ont été prises avec un film couleur Kodak Gold 400. Nous avons également utilisé un montage similaire mais avec un appareil photo numérique Nikon Coolpix en mode macro.

Annexe 3. Préparation des échantillons destinés à être placés en apesanteur

Dès le début des expériences de simulation d'apesanteur dans les clinostats 2D et 3D, nous avons rencontré d'importants problèmes liés à la présence de nombreuses petites bulles d'air restant dans l'échantillon. Quand on prépare une solution de tubuline, on prend soin à la fin de la préparation de bien dégazer la solution pour éliminer les grosses bulles d'air coincées dans la cuve en verre et surtout les gaz dissous (cf. Annexe 1). Malheureusement il est très difficile de dégazer parfaitement les solutions. Il reste donc souvent des bulles coincées dans le col des échantillons après fermeture du bouchon et des bulles naissant spontanément à partir des gaz dissous encore trop abondants dans les solutions.

La présence de bulles s'était relevée aussi désastreuse qu'instructive lors de l'expérience d'auto-organisation embarquée dans le vol MAXUS 3 [Papaseit et al 2000]. Lors de la réentrée du module de vol dans l'atmosphère, les échantillons ont subi plusieurs dizaines de g d'accélération (vibrations stochastiques) durant une courte période de quelques secondes. Sous cette accélération, quelques bulles d'air encore présentes se sont déplacées à grande vitesse en traversant de part en part les échantillons. Leur passage à travers les solutions en microgravité a provoqué l'auto-organisation partielle d'échantillons qui n'auraient normalement pas dû s'auto-organiser [Tabony et al 2002-a, Tabony et al 2002-b] (cf. Effets des cisaillements, 1^{ère} Partie, 2^{ème} Chapitre, Section C.2). Nous avons également observé ce phénomène dans les cuves placées en apesanteur simulée dans les clinostats [Tabony et al 2001-b].

L'étape critique de la préparation se situait lors du dégazage, trop insuffisant dans des échantillons préparés comme nous le faisons jusque là au laboratoire. Cet épisode a nécessité de mettre au point une technique de préparation efficace qui sera utilisée plus tard, en particulier pour le vol expérimental que nous préparons actuellement.

Dans un premier temps, avant de trouver cette technique de dégazage, nous avons eu l'idée de pré-assembler les solutions pendant 3 minutes, cuves verticales et clinostat arrêté. Ceci permet de bloquer les éventuelles petites bulles dans le col et le haut de la cuve par la forte augmentation de viscosité du milieu après 3 minutes d'assemblage des microtubules. Les échantillons ne subissant pas de fortes accélérations, ceux-ci avaient peu de chance d'être gênés par d'éventuelles bulles provenant du col. Cette technique était assez efficace, et nous avons pu vérifier qu'il n'y avait aucune différence de comportement entre les échantillons pré-assemblés et les autres. Le pré-assemblage (3 minutes) était fini bien avant l'instant critique du processus (6ème minute) ; les échantillons étaient donc en train de tourner depuis 3 minutes dans la machine quand ils sont arrivés au point de bifurcation. Cela à amplement suffit à obtenir l'effet voulu.

Ensuite, nous avons affiné la technique de dégazage. On commence par un dégazage d'une heure de la solution dans un tube large (pour augmenter la surface à dégazer). Après une heure, on remplit les cuves en verre jusqu'au col et on les dégaze 30 minutes. Le col est ensuite rempli à raz bord de solution de tubuline et on dégaze encore 15 minutes. La fine couche de solution au contact de l'air est enlevée par pipetage (environ 30 μ l) et l'échantillon est immédiatement scellé comme suit. On injecte à la surface de la solution 20 μ l d'huile de silicone (inerte). La pellicule d'huile permet d'isoler la solution de l'air. Enfin on met le bouchon en plastique préalablement huilé. Avec cette méthode les échantillons n'avaient pas besoin d'être pré-assemblés.

Pour assurer une bonne reproductibilité et une bonne comparaison entre les échantillons, chaque série d'expériences a été effectuée avec le même lot de tubuline, et dans chaque série, tous les échantillons provenaient de la même solution (tubuline + GTP + MEM).

Annexe 4. Valeurs de l'accélération centrifuge dans un clinostat en rotation

Le tableau suivant contient les valeurs de l'accélération centrifuge (en 'g') en fonction de la vitesse de rotation 'w' du clinostat (en °/s) et de la position 'r' (en mm) dans l'échantillon par rapport au centre de rotation du clinostat.

r (mm) \ w (°/s)	60	180	360
2.5	$8 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$

5	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$
10	$4 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
15	$6 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$6.1 \cdot 10^{-2}$
20	$8.1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$8.1 \cdot 10^{-2}$
25	$1 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$
30	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-1}$
35	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$
40	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$1.6 \cdot 10^{-1}$

r (mm) \ w (°/s)	540	720
1	$9 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$
2	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$3.2 \cdot 10^{-2}$
2.5	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
3	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$4.8 \cdot 10^{-2}$
4	$4.5 \cdot 10^{-2}$	$6.5 \cdot 10^{-2}$
5	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-2}$

Annexe 5. Annexes des expériences en champs magnétiques

5.1 Caractéristiques de l'aimant : aspect du champ et des gradients de champ

L'aimant utilisé est formé d'une bobine électromagnétique fonctionnant en supraconduction. Ses caractéristiques sont fixées, donc l'aspect des courbes de champ et de gradient de champ, ainsi que la position des maximums d'intensité du champ et du gradient de champ restent identiques quelles que soient les valeurs de champ utilisées. Au centre de la bobine, à 89.5 cm du sommet de l'aimant, se situe la position de champ maximal noté Hmax. Dès que l'on s'éloigne de cette position, le champ décroît rapidement. La courbe donnant les valeurs de champ en fonction de la position dans l'aimant a un aspect de gaussienne. La valeur de champ est quasiment nulle à 50 cm de la position Hmax (Figure 52 A).

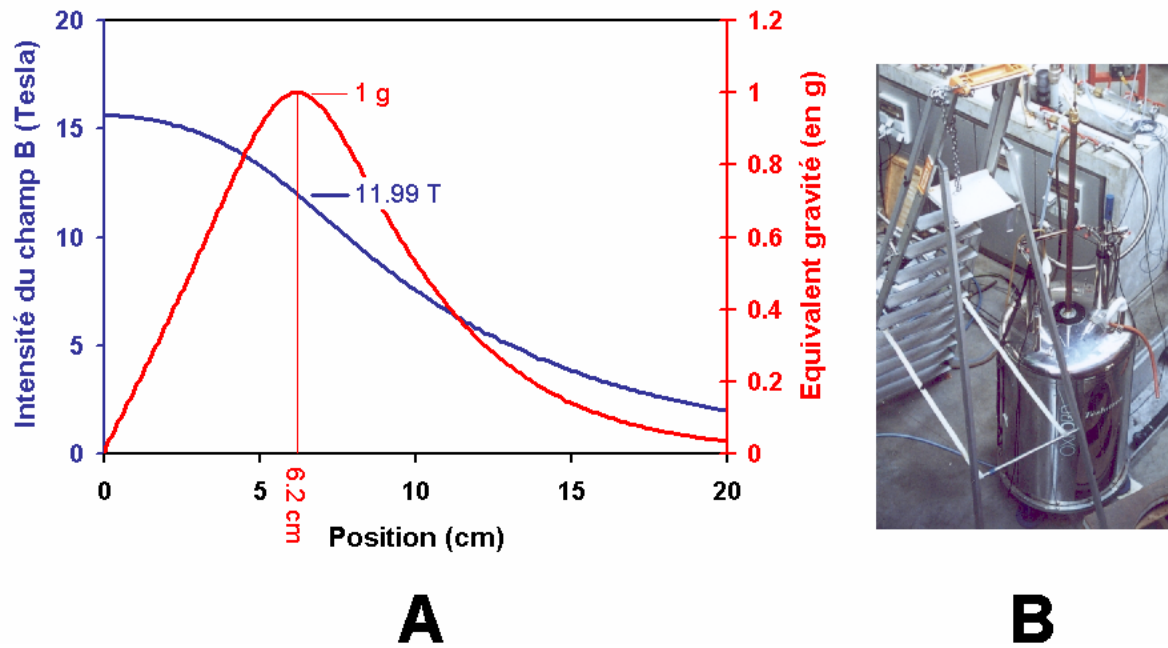


Figure 52. Courbe de champ et de gradient de champ de l'aimant de lévitation magnétique (A). La courbe bleue montre l'aspect du champ magnétique en fonction de la position dans l'aimant par rapport au centre magnétique de l'aimant. La courbe rouge est obtenue par un calcul impliquant la dérivation de la courbe de champ magnétique. Elle correspond à l'équivalent en accélération de la pesanteur due au gradient de champ magnétique induit par la variation de champ. Les positions de champ maximal et d'accélération maximale sont indiquées avec les valeurs de champ correspondantes. Le champ étant symétrique, un seul côté de la courbe est représenté. L'aimant supraconducteur dans lequel ont été faites les expériences de lévitation (B). On distingue la chemise chauffante cuivrée qui dépasse de l'aimant.

De part et d'autre de cette position se situent les points de gradient maximal, c'est-à-dire les points où la résultante d'accélération ou gravité effective atteint 0 g au-dessus de H_{max} et 2 g au-dessous de H_{max} . Au niveau de la position H_{max} , il n'y a pas de gradient de champ ; la gravité effective y est donc de 1 g. Pour signifier que ces valeurs de gravité sont obtenues dans un aimant, ces trois positions sont respectivement notées '0 gH', '1 gH' et '2 gH' lorsque le champ maximal est de 15.62 T, valeur à laquelle on obtient la lévitation des solutions de microtubules (Figure 52 B).

Les valeurs de champ magnétique au niveau des positions '0 gH' et '2 gH' sont égales, la gaussienne étant symétrique' et sont obtenues par simple multiplication de la valeur de champ maximal utilisé, H_{max} , par la valeur de champ normalisé (une courbe caractéristique de la bobine) en ce point.

5.2 Détermination du point de lévitation et des valeurs de champ pour la lévitation

5.2.1 Détermination de la valeur du champ magnétique maximal dans la bobine pour provoquer la lévitation de la solution de tubuline.

Pour déterminer le point de lévitation, il suffit de déterminer la valeur de champ à laquelle une goutte de solution de microtubules lévite.

Comme il est difficile de placer une goutte de solution de microtubules isolée, on commence par faire léviter un récipient de masse m_1 . Le récipient utilisé était une petite boîte cylindrique de dimensions 13x13 mm, de contenance 1.5 ml et de masse $m_1=0.56$ g (une boîte de safran qu'on trouve dans le commerce). On mesure le champ nécessaire à la lévitation de la boîte en mettant le champ à une valeur élevée et en le diminuant lentement jusqu'à ce que la boîte finisse par tomber. La valeur de champ maximal mesuré pour la boîte vide est de 13.7 Teslas.

Ensuite on répète la mesure, la boîte contenant 1.5 ml de solution de tubuline assemblée à 10 mg ml^{-1} avec 2 mM de GTP. La masse totale m_3 de la boîte était de 2.166 g soit une masse m_2 de solution de tubuline de 1.61 g. Cette fois-ci, la valeur de champ maximal mesurée est de 15.05 Teslas.

On cherche à déterminer la valeur de champ maximal B_2 nécessaire pour faire léviter une goutte de solution de tubuline assemblée.

$$\text{On sait que } mg = m \frac{\chi}{\rho} \frac{1}{\mu_0} B \frac{dB}{dz}$$

avec m la masse de matière mise dans le champ, χ la susceptibilité magnétique de cette matière et ρ sa masse volumique. μ_0 est la permittivité du vide.

Or la valeur du gradient de champ $\left(\frac{dB_x}{dz} \right)_{B_x}$ pour une valeur de champ maximal B_x est proportionnelle à la valeur du gradient de champ normalisé $\left(\frac{dB_0}{dz} \right)_{B_0}$ pour un champ maximal

B_0 dans la bobine égal à 1 Tesla.

Donc $\left(\frac{dB_x}{dz}\right)_{B_x} = \left(\frac{dB_0}{dz}\right)_{B_0} \cdot B_x$ ce qu'on peut noter $\left(\frac{dB_x}{dz}\right)_{B_x} = \varepsilon \cdot B_x$

On peut ainsi écrire $mg = m \frac{\chi}{\rho} \frac{1}{\mu_0} \varepsilon B^2$ ou encore $mg = m \frac{\chi}{\rho} \alpha B^2$

Les forces sont additives, donc $m_3 g = m_1 g + m_2 g$

d'où $\left(m_1 \frac{\chi_1}{\rho_1} + m_2 \frac{\chi_2}{\rho_2}\right) \alpha B_3^2 = (m_1 + m_2) g$

or $m_1 g = m_1 \frac{\chi_1}{\rho_1} \alpha B_1^2$ et $m_2 g = m_2 \frac{\chi_2}{\rho_2} \alpha B_2^2$

autrement dit $m_1 \chi_1 = \frac{m_1 g \rho_1}{\alpha B_1^2}$ et $m_2 \chi_2 = \frac{m_2 g \rho_2}{\alpha B_2^2}$

donc par substitution on obtient $\left(\frac{m_1 g \rho_1}{\alpha B_1^2 \rho_1} + \frac{m_2 g \rho_2}{\alpha B_2^2 \rho_2}\right) \alpha B_3^2 = (m_1 + m_2) g$

et après simplification $\left(\frac{m_1}{B_1^2} + \frac{m_2}{B_2^2}\right) B_3^2 = m_1 + m_2$, soit $B_2 = \sqrt{\frac{m_2 B_3^2}{m_1 + m_2 - m_1 \left(\frac{B_3}{B_1}\right)^2}}$

La valeur calculée du champ maximal dans la bobine nécessaire pour obtenir la lévitation d'une solution de tubuline assemblée à 10 mg ml^{-1} est de 15.62 Teslas.

5.2.2 Détermination du point de lévitation et de la valeur du champ magnétique en ce point.

La position du point de lévitation où se situe la force maximale exercée par le gradient de champ magnétique, est déterminée par la valeur maximale du produit $B \frac{dB}{dz}$ au-dessus du centre magnétique de la bobine. En ce point, la résultante des forces est nulle quand on est en lévitation magnétique et l'accélération résultante de la pesanteur est équivalente à 0 g (0 N.m.s⁻²). En calculant en tout point de la bobine ce produit, on obtient ce point à 62 mm du centre magnétique de la bobine.

Au point symétrique par rapport au centre magnétique, la résultante des forces est équivalente au double du poids. Cela correspond en fait à l'application de la force générée par le gradient de champ magnétique dans la même direction que la pesanteur. En ce point, 62 mm en dessous du centre magnétique, l'accélération résultante est équivalente à 2 g.

Enfin, au centre magnétique de la bobine, le champ magnétique est maximal, mais le gradient de champ est nul. L'accélération résultante de la pesanteur est donc équivalente à 1 g.

Ces trois points sont fixes, quelle que soit la valeur du champ utilisé, car liés aux caractéristiques physiques de la bobine.

Cependant, il ne faut pas oublier qu'en plus de l'application de forces en ces trois points, il y a un champ magnétique qui s'exerce sur l'échantillon. Ce champ magnétique exerce un couple magnétique sur les objets magnétiquement anisotropes présents, comme par exemple des objets fibrillaires ou ayant une quelconque autre anisotropie de forme. Le champ magnétique est maximal au centre magnétique de la bobine, et il reste élevé en position 0 gH et 2 gH puisqu'il ne chute qu'à 77 % de la valeur maximale du champ. Dans les positions témoins, c'est-à-dire à environ 1 m du centre de la bobine, le champ et le gradient de champ ne sont plus que résiduels et sans effets.

5.3 Conception du porte-échantillons pour l'aimant : vitesse de réchauffement et position des échantillons

Les conditions thermiques pour obtenir l'auto-organisation correcte des microtubules, c'est-à-dire comme celle que l'on obtient pour des échantillons placés en chambre chaude sans support, sont draconiennes. Les microtubules pour s'assembler puis s'auto-organiser doivent être rapidement réchauffés de 4°C à 35°C. Les aimants utilisés étaient dans une pièce à température ambiante (18°C). Pour faire nos expériences, il a donc fallu fabriquer un système de porte-échantillons chauffant entrant dans le tube fin de l'aimant long de 140 cm et de 3 cm de diamètre. Ce système se compose de deux parties. Tout d'abord une chemise chauffante composée de deux tubes de Cuivre imbriqués l'un dans l'autre, entre lesquels circule de l'eau à la température souhaitée afin de fournir un maximum d'inertie thermique au système. Ensuite un système de porte-échantillons chauffant contenant plusieurs emplacements pour des cuves en verre de 4 cm (400 µl) ou de 2 cm (200 µl) de haut. Le porte-échantillons est constitué de deux blocs métalliques usinés pour accepter trois cuves chacun, et séparés par une longue tige métallique de 75 cm. L'ensemble est suspendu au bout d'une tige métallique de 120 cm dépassant du sommet de la chemise d'eau longue de 250 cm environ, et est parcouru de tuyaux chauffant les pièces métalliques.

En ce qui concerne la position des échantillons, ceux-ci ont été placés de façon à ce que le centre des trois cuves corresponde aux trois positions d'intérêt dans l'aimant, à savoir les positions correspondant au gradient maximal dirigé vers le haut en haut, au gradient nul

mais à champ magnétique maximal au milieu et au gradient maximal dirigé vers le bas en bas. Ces trois positions correspondent respectivement aux positions '0 gH', '1 gH' et '2 gH' lorsque la valeur de Hmax, l'intensité maximale du champ, est de 15.62 Teslas.

Ce matériel a été testé d'abord en chambre chaude, puis en fonctionnement au laboratoire, puis dans l'aimant éteint, horizontalement et verticalement. Dans tous les cas, les échantillons ont abouti à des morphologies satisfaisantes.

Annexe 6. Équations cinétiques du modèle

Dans cette annexe est énumérée l'intégralité des équations cinétiques du modèle. Les explications les concernant sont détaillées dans le 1^{er} Chapitre de la 2^{ème} partie, section 3, "Cinétiques réactionnelles".

Expression de la dépendance non linéaire: fonctions de Hill

$$[TGTP_{eff}] = f_{TGTP} \cdot [TGTP]$$

$$f_{TGTP} = \frac{[TGTP]}{[TGTP] + [TGDP]}$$

$$F([TGTP_{eff}], n_{Growth}, \lambda_{Growth}) = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{[TGTP_{eff}]}{\lambda_{Growth}} \right)^{n_{Growth}}}$$

$$G([MT_{TGTP}], n_{Shrink}, \lambda_{Shrink}) = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{[MT_{TGTP}]}{\lambda_{Shrink}} \right)^{n_{Shrink}}}$$

À l'extrémité positive (+)

$$\frac{d[TGTP]^+}{dt} = -V_{\max Growth}^+ \cdot F([TGTP_{eff}]^+, n_{Growth}^+, \lambda_{Growth}^+)$$

$$\frac{d[TGDP]^+}{dt} = V_{\max Shrink}^+ \cdot \left(1 - G([MT_{TGTP}]^+, n_{Shrink}^+, \lambda_{Shrink}^+) \right)$$

$$\frac{d[MT^+]}{dt} = V_{\max Growth}^+ \cdot F([TGTP_{eff}]^+, n_{Growth}^+, \lambda_{Growth}^+) - V_{\max Shrink}^+ \cdot \left(1 - G([MT_{TGTP}]^+, n_{Shrink}^+, \lambda_{Shrink}^+) \right)$$

$$\frac{d[MT_{TGTP}^+]}{dt} = V_{\max Growth}^+ \cdot F([TGTP_{eff}]^+, n_{Growth}^+, \lambda_{Growth}^+) - V_{\max Shrink}^+ \cdot \left(1 - G([MT_{TGTP}]^+, n_{Shrink}^+, \lambda_{Shrink}^+) \right) - V_{conv}^+$$

À l'extrémité négative (-)

$$\frac{d[TGTP]^-}{dt} = -V_{\max Growth}^- \cdot F([TGTP_{eff}^-], n_{Growth}^-, \lambda_{Growth}^-)$$

$$\frac{d[TGDP]^-}{dt} = V_{\max Shrink}^- \cdot (1 - G([MT_{TGTP}^-], n_{Shrink}^-, \lambda_{Shrink}^-))$$

$$\frac{d[MT^-]}{dt} = V_{\max Growth}^- \cdot F([TGTP_{eff}^-], n_{Growth}^-, \lambda_{Growth}^-) - V_{\max Shrink}^- \cdot (1 - G([MT_{TGTP}^-], n_{Shrink}^-, \lambda_{Shrink}^-))$$

$$\frac{d[MT_{TGTP}^-]}{dt} = V_{\max Growth}^- \cdot F([TGTP_{eff}^-], n_{Growth}^-, \lambda_{Growth}^-) - V_{\max Shrink}^- \cdot (1 - G([MT_{TGTP}^-], n_{Shrink}^-, \lambda_{Shrink}^-)) - V_{conv}^-$$

Dans l'ensemble de l'espace de réaction

$$\frac{d[TGTP]}{dt} = k_{reg} \cdot [TGDP] - q_{nuc} \cdot \exp\left(\frac{[TGTP_{eff}] - z_{nuc}}{s_{nuc}}\right) + \nabla(D_{Tubulin} \cdot \nabla[TGTP])$$

$$\frac{d[TGDP]}{dt} = -k_{reg} \cdot [TGDP] + \nabla(D_{Tubulin} \cdot \nabla[TGDP])$$

$$\frac{d[Oligomers]}{dt} = q_{nuc} \cdot \exp\left(\frac{[TGTP_{eff}] - z_{nuc}}{s_{nuc}}\right)$$

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.
(1983) *Molecular biology of the cell*, Garland Publ. Inc. New York
Edition française (*Biologie moléculaire de la cellule*), Flammarion Médecine Sciences, 1986

Arthur W. B.
Complexity and the economy
Science (1999) **284**, pp 107-109

Asai R., Taguchi E., Kume Y., Saito M., Kondo S.
Zebrafish leopard gene as a component of the putative reaction-diffusion system
Mech Dev (1999) **1-2**, pp 87-92

Babloyantz A.
Molecules, dynamics and life
Wiley, New York, 1986

Bak P.
(1996) *How nature works. The science of self-organized criticality*, Springer-Verlag New York, Inc.
Réédition version française (*Quand la nature s'organise : avalanches, tremblements de terre et autres catastrophes*), 1999, Flammarion, Paris

Bakker Magnetics.
Aimant permanent céramique de type BM7
Ref BM84246

Bard Jonathan B. L.
A model for generating aspects of Zebra and other mammalian coat patterns
J. Theor. Biol. (1981) **93**, pp 363-385

Barkley D. S.
Science N. Y. (1969) **165**, pp 1133

Barnes F. S.
Radio-microwave interactions with biological materials
Health Phys. (1989) **56:1**, pp 759-766

Bayley P. M., Schilstra M. J., Martin S. R.
A simple formulation of microtubule dynamics: quantitative implications of the dynamic instability of microtubule populations in vivo and in vitro
J. Cell Sci. (1989) **93**, pp 241-254

Beckers R., Deneubourg J-L., Goss S.

Trails and U-turns in the selection of the path by the ant Lasius niger

J. Theor. Biol. (1992) **159**, pp 397-415

Beaugnon E., Tournier R.

Levitation of organic materials

Nature (1991) **349**, p 470

Ben-Jacob E., Schochet O., Tenenbaum A., Cohen I., Czirok A., Vicsek T.

Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies

Nature (1994) **368**, pp 46-49

Belousov B. P.

A periodic reaction and its mechanism

1951, reimprimé dans "*Oscillations and travelling waves in chemical systems*", Eds. R. Field and M. Burger. Wiley, New-York (1985) pp 605-613.

Belousov B. P.

A periodic chemical reaction and its mechanism

Sb. Ref. Radiats. Med. Medgiz, Moscow (1958) pp 145-147.

Bénard H.

Les tourbillons cellulaires dans une nappe liquide

Rev. Gen. Sci. Pure Appl. (1900) **12**, pp 1261-1271

Bergé P., Pomeau Y. Vidal C.

Order within chaos: Towards a deterministic approach to turbulence

Wiley New York, 1984

Bergé P., Pomeau Y., Dubois-Gance M.

Des rythmes au chaos

Editions Odile Jacob (1994) collection "opus" (1997)

Bonabeau E., Dorigo M., Theraulaz G.

Swarm intelligence. From natural to artificial systems

Oxford University Press, New York, 1999

Bonabeau E., Theraulaz G.

L'intelligence en essaim

Pour la science (2000) **271**, pp 66-73

Bonne D., Heusele C., Simon C., Pantaloni D.

4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules.

J. Biol. Chem. (1985) **260**, pp 2819-2825

Bonner J. T.

The cellular slime moulds

Princeton University Press, New Jersey, 1967

Bras W., Diakun G. P., Diaz J. F., Maret G., Kramer H., Bordas J., Medrano F. J.

The susceptibility of pure tubulin to high magnetic fields: a magnetic birefringence and X-Ray fiber diffraction study

Biophys. J. (1998) **74**, pp 1509-1521

Bray W. C.

A periodic reaction in homogenous solution and its relation to catalysis

J. Am. Chem. Soc. (1921) **43**, pp 1262-1267

Buffon [George-Louis Leclerc, Comte de]

'Histoire Naturelle Générale et Particulière : avec la description du Cabinet du Roi', (Histoire Naturelle : 1746-1788), Num. BNF de l'éd. de Leiden. Reprod. de l'éd. de A Paris : de l'Impr. royale

(a) Tome II, Chapitre V "*Exposition des systèmes & des travaux anatomiques au sujet de la génération*"

(b) Tome I, Premier Discours "*De la manière d'étudier & de traiter l'Histoire Naturelle*"

(c) Tome II, Chapitre II "*De la Reproduction en général*"

(d) Tome VI, "*Les animaux sauvages*"

(e) Tome II, Chapitre IV "*De la génération des animaux*"

(f) Tome II, Chapitre X "*De la formation du fœtus*"

(g) Tome II, Chapitre III "*De la nutrition & du développement*"

Buxbaum R. E., Dennerll T., Weiss S., Heidermann S. R.

F-actin and microtubule suspensions as intermediate fluids

Science (1987) **235**, pp 1511-1514

Caplow M., Shanks J.

Induction of microtubule catastrophe by formation of tubuline-GDP and apotubulin subunits at microtubule ends

Biochemistry (1995) **34**, pp 15732-15741

Carlier M-F., Melki R., Pantaloni D., Hill T. L., Chen Y.
Synchronous oscillations in microtubule polymerisation
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) **84**, pp 5257-5261

Carlier M-F., Pantaloni D.
Kinetic analysis of Guanosine 5'-Triphosphate hydrolysis associated with tubuline polymerization
 Biochemistry (1981) **20**, pp 1918-1924

Castets V., Dulos E., Boissonade J., de Kepper P.
Experimental evidence of a sustained standing Turing-type non-equilibrium chemical pattern
 Phys. Rev. Lett. (1990) **64**, pp 2953-2956.

Chauvin R.
Contribution à l'étude de la construction du dôme chez Formica rufa, II
 Insect. Soc. (1959) **6:1**, pp 1-11

Chen Y., Hill T. L.
Monte Carlo study of the GTP cap in a five-start helix model of a microtubule
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) **82**, pp 1131-1135

Chretien D., Wade R. H.
New data on the microtubule surface lattice
 Biol. Cell. (1991) **71**, pp 161-174

Cleine J. H., Dixon K. E.
The effect of egg rotation on the differentiation of primordial germ cells in Xenopus laevis
 J. Embryol. Exp. Morphol. (1985) **90**, pp 79-99.

Cogoli A., Gmünder F.
 Adv. Space. Biol. Med. (1991) **1**, pp 183-248

Cogoli-Greuter M., Spano A., Sciola L., Pippia P., Cogoli A.
Influence of microgravity on mitogen binding, motility and cytoskeleton patterns of T lymphocytes at Jurkat cells. Experiments on sounding rockets
 J. J. Aerospace Env. Med. (1998) **35**, pp 27-39.

Cogoli A., Valluchi-Morf M., Müller M., Briegleb W.
 Aviat. Space. Environ. Med. (1980) **51**, pp 29-34

Cohen M. H., Robertson A.

Wave propagation in the early stages of aggregation of cellular slime molds

J. Theor. Biol. (1971) **31**, pp 101-118

Communications Privées

(a) Tabony J. et Papaseit C. initialement, puis avec Demongeot J. et Glade N., à propos des mécanismes moléculaires aux fondements de l'auto-organisation.

(b) Hodges A., au cours du séminaire "Turing Day" à Lausanne, Suisse, le 28 Juin 2002

(c) Tabony J., pensait bien avant de l'avoir observé que l'auto-organisation des microtubules pourrait induire non seulement le mouvement de particules colloïdales dans la solution, mais également leur auto-ordonnement, les microtubules étant voués à cette tâche dans les cellules vivantes.

(d) Expériences préliminaires sur le mouvement de particules colloïdales, faites au laboratoire avec Papaseit C. puis Baconnier S.

(e) Tabony J., a mesuré la consommation de GTP au cours du temps en fonction de paramètres contrôlant la réactivité des microtubules, en particulier en fonction de la température et en fonction de la concentration initiale en tubuline.

Coveney P. R., Highfield R.

Frontiers of complexity

Random House, New York, 1995

Coveney P. R., Highfield R.

The arrow of time

W. H. Allen (Ed.), London, 1990

Cox E.

Modeling and experiment in developmental biology

Curr. Opin. Gen. Dev. (1992) **2**, pp 647-650

Darnell J., Lodish H., Baltimore D.

'Molecular cell biology'

Scientific American Inc., New York, 1986

De Kepper P., Dulos E.

La chimie des formes

Pour la Science (1997) **235**, pp 34-39

De Kepper P., Dulos E., De Wit A., Dewel G., Borckmans P.

Taches rayures et labyrinthes

La recherche (1998) **305**, pp 84-89

Denegre J. M., Valles J. M., Lin Jr. K., Jordan W. B., Mowry K. L.
Cleavage planes in frog eggs are altered by strong magnetic fields
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) **95**, pp 14729-14732

Deneubourg J-L., Goss S.
Collective patterns and decision making
 Ethol. Ecol. Evol. (1989) **1**, pp 295-311

Descartes René
Le Monde, 1644, et le *Traité de l'Homme*, 1664
 Dans 'Œuvres Philosophiques', Tome Premier, Editions Garnier Frères, 1963

Dogterom M., Yurke B.
Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules
 Science (1997) **278**, pp 856-860

Dupont G., Goldbeter A.
Oscillations and waves of cytosolic calcium: insights from theoretical models
 Bioessays (1992) **14**, pp 485-493.

Dustin P.
Microtubules
 Springer-Verlag, Berlin, 1984

Edelstein-Keshet L.
Mathematical models in biology
 McGraw-Hill Inc., New York, 1988

Eisman J. A.
Good, good, good ... good vibrations: the best option for better bones?
 The Lancet (2001) **358**, pp 1924-1925

Elmoznino, Hervé
Influence du cycle de vie individuel sur la dynamique spatiale d'une forêt monospécifique.
Analyse à travers un automate cellulaire – 119p
 Th: Mathématiques: Sofia-Antipolis: 1999

Geim A.
Everyone's magnetism
 Physics Today (Sept. 1998), pp 36-39

Gildersleeve R. F., Cross A. R., Cullen K. E., Fagen A. P., Williams R. C. Jr.

Microtubules grow and shorten at intrinsically variable rates

J. Biol. Chem. (1992) **267:12**, pp 7995-8006

Girard S., Lückoff A., Lechleiter J., Sneyd J., Clapham D.

Two-dimensional model of calcium waves reproduces the patterns observed in Xenopus oocytes

Biophys. J. (1992) **61**, pp 509-517

Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J.

Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape

J. Cell. Biol. (1993) **120:4**, pp 923-934

Glade N., Tabony J.

The effect on microtubule self-organisation of reduced gravity levels produced in ground based experiments; comparison with space flight experiments

J. Phys.IV, France (2001) **6**, pp 255-260

Glansdorff P., Prigogine I.

Thermodynamic theory of structure, stability and fluctuations

Wiley, New York, 1971.

Gleick J.

(1987) '*Chaos*'. Penguin, London

Réédition version française (*La théorie du chaos*), 1991, Champs, Flammarion

Goldberger A. L.

Non linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside

The Lancet (1996) **347**, pp 1312-1314

Goldbeter A.

(1990) *Rythmes et chaos dans les systèmes biochimiques et cellulaires*, Masson, Paris

Edition anglaise révisée (*Biochemical oscillations and cellular rhythms. The molecular bases of periodic and chaotic behaviour*), Cambridge university press, 1996

Goss S., Aron S., Deneubour J-L., Pasteels J. M.

Self-organized shortcuts in the Argentine ant

Naturwissenschaften (1989) **76**, pp 579-581

Grassé P. P.

La reconstruction du nid et les coordinations inter-individuelles chez Bellicositermes Natalensis et Cubitermes sp. La théorie de la stigmergie : Essai d'interprétation du comportement des termites constructeurs

Ins. Soc. (1959) **6**, pp 41-80

Haller A. V.

Elementa Physiologiae Corporis Humani (1757-1766)

Harboe M., Closs O.

Immunological aspects of leprosy, pp 1232-1233

Dans 'Fourth international congress of immunology. *Immunology 80. Progress in Immunology IV*' (1980), Fougereau M. and Dausset J. (Ed.), Academic Press Inc., London

Harris P. J., Clason E. L.

Conditions for assembly of tubulin-based structures in unfertilized sea urchin eggs

J. Cell Sci. (1992) **102**, pp 557-567

Harrison L.

Kinetic theory of living pattern

Cambridge University, 1993

Harrison L.

What is the status of Reaction-Diffusion theory thirty-four years after Turing

J. Theor. Biol. (1987) **125**, pp 369-384

Helbing D., Keltsch J., Molnár P.

Modelling the evolution of human trail systems

Nature (1997) **388**, pp 47-50

Heyn A. N. J.

Fiber Microscopy

Intersciences Publishers, Inc., New York, 1954

Hill T. L.

Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) **78:9**, pp 5613-5617

Hill T. L., Kirschner M. W.

Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: Possible conversion of chemical free energy into mechanical work

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1982) **79**, pp 490-494

Hodges A.

Alan Turing. The Enigma

Vintage edition, 1992

Hölldobler B., Wilson E. O.

The ants

Springer-Verlag, Berlin, 1991

Holy T. E., Leibler S.

Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) **91**, pp 5682-5685

Horio T., Hotani H.

Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy

Nature (1986) **321**, pp 605-607

Houston L. L., Odel J, Lee Y. C., Himes R. H.

Solvent isotope effects on microtubule polymerization and depolymerization

J. Mol. Biol. (1974) **87**, 141-146

Hughes-Fulford M., Lewis M. L.

Effects of microgravity on osteoblast growth activation

Exp. Cell Res. (1996) **224**, pp 103-109.

Hunding A., Kauffman S. A., Goodwin B. C.

Drosophila segmentation: supercomputer simulation of prepatter hierarchy

J. Theor. Biol. (1990) **145**, pp 369-384

Keating T. J., Borisy G. G.

Centrosomal and non-centrosomal microtubules

Biology of the cell (1999) **91**, pp 321-329

Kolmogorov A. N., Petrovsky I. G., Piskunov N. S.,

Une investigation de l'équation de la diffusion combinée avec un accroissement de masse et son application à un problème biologique (Traduit du Russe)

1937, dans 'Selected works of A. N. Kolmogorov'

V. M. Tikhomirov (Ed.), Kluwer Academic Publishers, 1991

Kondepudi D., Prigogine I.
Sensitivity of non-equilibrium chemical systems to gravitational field
 Adv. Space. Res. (1983) **3:5**, pp 171-176

Kondepudi D., Prigogine I.
Sensitivity of non-equilibrium systems
 Physica A. (1981) **107**, pp 1-24.

Kondepudi D.
Sensitivity of chemical dissipative structures to external fields: formation of propagating bands
 Physica A (1982) **115**, pp 552-566.

Kondo S., Asai R.
A Reaction-Diffusion wave on the skin of the marine angelfish Pomacanthus
 Nature (1995) **376**, pp 765-768

Konijn T. M., Van De Meene J. G. C., Bonner J. T., Barkley D. S.
The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1967) **58**, pp 1152-1154

Koschmieder E. L., Pallos S. G.
 Int. J. Mass. Trans. (1974) **17**, pp 991

LeBlanc A., Shackelford L., Schneider V.
Future human bone research in space
 Bone (1998) **22**, pp 113s-116s

Lechleiter J., Girard S., Peralta E., Clapham D.
*Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes*
 Science (1991) **252**, pp 509-517.

Lewis M. L, Reynolds J. L, Cubano L. A., Hatton J. P., Lawless B., and Piepmeier E. H.
Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat)
 Faseb J. (1998) **12**, pp 1007-1018.

Locke John
Discours sur les miracles, p309
 1702-1704, dans "*Oeuvres diverses de monsieur Locke*", Num. BNF de l'éd. de Amsterdam :
 J.F. Bernard, 1732

Lorenz E. N.

Deterministic nonperiodic flow

J. Atmos. Sci. (1963) **20**, pp 130-141

Lotka A. J.

Contribution to the theory of periodic reactions

J. Phys. Chem. (1910) **14**, pp 271-274

Mandelkow E., Mandelkow E-M., Hotani H., Hess B., Müller S.

Spatial patterns from oscillating microtubules

Science (1989) **246**, pp 1201-1203

Mandelkow E. M., Lange G. Jagla A., Spann U., Mandelkow E.

Dynamics of the microtubules oscillator : role of nucleotides and tubuline-MAP interactions

EMBO J. (1988) **7:2**, pp 357-365

Margolis R. L., Wilson L.

Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro

Cell (1978) **13**, pp 1-8

Martiel J. L., Goldbeter A.

A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in Dictyostelium cells

Biophys. J. (1987) **52**, pp 807-828

Martin S. R., Schilstra M. J., Bayley P. M.

Dynamic instability of microtubules: Monte Carlo simulation and application to different types of microtubule lattice

Biophys. J. (1993) **65**, pp 578-596

Marx A., Mandelkow E.

A model of microtubule oscillations

Eur. Biophys. J. (1994) **22**, pp 405-421

May R. M.

Simple mathematical models with very complicated dynamics

Nature (1976) **261**, pp 459-467

May R. M.

When two and two make four : non linear phenomena in ecology

Proc. R. Soc. Lond. (1986) **B228**, pp 241-266

Meinhardt H.

Models of biological pattern formation

Academic Press, London, 1982.

Melki R., Carlier M-F., Pantaloni D.

Oscillations in microtubule polymerization: the rate of GTP regeneration on tubulin controls the period

EMBO J. (1988) **7:9**, pp 2653-2659

Mesland D. A., Anton A. H., Willemsen H., van den Ende H.

Microgravity Sci. Technol. (1996) **9**, pp 10-14

Mitchison T., Kirschner M.

Dynamic instability of microtubule growth

Nature (1984) **312**, pp 237-242

Murray J.

Mathematical biology

Springer, Berlin, 1990.

Newell P. C.

Fungal differentiation

Mycology series; Smith J. (Ed.), M. Dekker, New York, 1983

Nicolis G. and Prigogine I.

Self-organisation in non-equilibrium systems

Wiley, New York, 1977.

Nicolis G., Prigogine I.

Exploring complexity

Freeman, New York, 1989.

Nixon R. A.

The slow axonal transport of cytoskeletal proteins

Curr. Op. Cell. Biol. (1998) **10**, pp 87-92

Obermann H., Mandelkow E. M., Lange G., Mandelkow E.

Microtubule oscillations: role of nucleation and microtubule number concentration

J. Biol. Chem. (1990) **265:8**, pp 4382-4388

Odde D. J.

Estimation of the diffusion-limited rate of microtubule assembly

Biophys. J. (1997) **73**, pp 88-96

Odde D. J., Cassimeris L., Buettner

Kinetics of microtubule catastrophe assessed by probabilistic analysis

Biophys. J. (1995) **69**, pp 796-802

Ouyang Q., Swinney H.

Transition from a uniform state to hexagonal and striped Turing patterns

Nature (1991) **352**, pp 610-612.

Page Faulk W., Greenwood B. M.

Infection Diseases, p 438

Dans '*Immunology in Medecine. A comprehensive guide to clinical immunology*', 1977

Holborow E. J. and Reeves W. G. (Ed.), Academic Press Inc., London

Panda D., Chakraborti G., Hudson J., Pigg K., Miller H. P., Wilson L., Himes R. H.

Suppression of microtubule dynamic instability and treadmilling by deuterium oxide

Biochemistry (2000) **39**, pp 5075-5081

Papaseit, Cyril

Formation de motifs microtubulaires in vitro et dans l'embryon de drosophile par des processus dissipatifs de type réaction-diffusion – 150p

Th: Physique: Grenoble: 1998

Papaseit C., Pochon N., Tabony J.

Microtubule self-organization is gravity dependant

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) **97:15**, pp 8364-8368

Papaseit C., Vuillard L., Tabony J.

Reaction-diffusion microtubule concentration patterns occur during biological morphogenesis

Biophys. Chem. (1999) **79**, pp 33-39

Parrish J. K., Edelstein-Keshet L.

Complexity, pattern, and evolutionary trade-off in animal aggregation

Science (1999) **284**, pp 99-101

Perelson A. S., Weisbuch G.

Immunology for physicists

Review of modern physics (1997) **69:4**, 1219-1267

Pickett-Heaps J. D., Northcote D. H.

Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems

J. Cell. Sci. (1966) **1**, 109-120

Pirollet F. Job D., Margolis R. L., Garel J. R.

An oscillatory mode for microtubule assembly

EMBO J. (1987) **6**, pp 3247-3252

Prigogine I., Stentger I.

Order out of chaos

Heinemann, London, 1984

Rashevsky Nicholas

An approach to the mathematical biophysics of biological self-regulation and of cell polarity

Bull. Math. Biophys. (1940) **2**, pp 15-25

Rashevsky Nicholas

Mathematical biophysics : Physico-mathematical foundations of biology

Dover Publications, Inc. New York, New York, 3^{ème} édition révisée, 1948

Lord Rayleigh

On convective currents in a horizontal layer of fluid when the higher temperature is on the under side

Phil. Mag. (1916) **32**, pp 529-546

Robert C., Bouchiba M., Robert R., Margolis R. L., Job D.

Self-organization of the microtubule network. A diffusion based model

Biol. Cell. (1990) **68**, pp 177-181

Roberts K., Hyams J. S. (Eds.)

Microtubules

Academic Press, New York, 1979

Rubin C., Xu G., Judex S.

The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli

FASEB J. (2001) **15**, pp 2225-2229

Salmon E. D., Saxton W. M., Leslie R. J., Karow M. L., McIntosh J. R.
Diffusion coefficient of fluorescein-labeled tubulin in the cytoplasm of embryonic cells of a sea urchin : video image analysis of fluorescence redistribution after photobleaching
 J. Cell. Biol. (1984) **99**, pp 2157-2164

Schwarzenberg M., Pippia P., Meloni M. A., Cossu G., Cogoli-Greuter M., Cogoli A.
 J. Gravit. Physiol. (1998) **5**, pp 23-26

Sept D., Limbach H. J., Bolterauer H., Tuszynski J. A.
A chemical kinetics model for microtubule oscillations
 J. Theor. Biol. (1999) **197**, pp 77-88

Sigma, Catalogue 1998

Références des billes de polystyrène

(a) Billes de 0.8 μm : Ref. LB-8

(b) Billes Superparamagnétiques de 0.8 μm : Ref L-0898

(c) Billes Fluorescentes de 1.01 μm [Excitation 575 nm, Emission 610 nm] : Ref. L-3155

(d) Billes de 1.09 μm : Ref. LB-11

(e) Billes de 3.2 μm : Ref. LB-30

(f) Billes de 6.4 μm : Ref. SD-6A

Stewart I.

1989, *Does god play dice ? The new mathematics of chaos*, Penguin London

Réédition française (*Dieu joue t-il aux dés ? Les mathématiques du chaos*), 1998, Champs Flammarion

Swinney H., Gollub J. P.

Hydrodynamic Instabilities and the Transition to Turbulence

Physics Today (1978) **31:8**, 41-49

Tabony J.

Can biochemical Turing processes account for biological gravitropism

LowG (1996-b) **7:3**, pp 10-13

Tabony J.

Morphological bifurcations involving Reaction-Diffusion processes during microtubule formation

Science (1994) **264**, pp 245-248

Tabony J

Self-organisation in a simple biological system through chemically dissipative processes
Nanobiology (1996-a) **4**, pp 117-137

Tabony J., Glade N., Demongeot J., Papaseit C.

Biological self-organization by way of microtubule reaction-diffusion processes
Langmuir (2002) **18:19**, pp 7196-7207

Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J.

Microtubule self-organisation and its gravity dependence
Advances in Space Biology and Medicine: Cell biology and biotechnology in space (2002-a),
Elsevier Science, A. Cogoli (Ed.) **8**, pp 19-58.

Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J.

The effect of gravity on microtubule self-organisation
J. Phys. IV France (2001-b) **11**, 239-246

Tabony J., Job D.

Gravitational symmetry breaking in microtubular dissipative structures
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992-b) **89**, 6948-6952

Tabony J., Job D.

Microtubular dissipative structures in biological auto-organization and pattern formation
Nanobiology (1992-a) **1**, pp 131-147

Tabony J., Job D.

Spatial structures in microtubular solutions requiring a sustained energy source
Nature (1990) **346**, pp 448-450

Tabony J., Papaseit C.

Microtubule self-organisation as an example of a biological Turing structure
Adv. Struct. Biol. (1998), **5**, pp 43-83

Tabony J., Pochon N., Papaseit C.

Microtubule self-organisation depends upon gravity
Adv. Space Res. (2001-a) **28:4**, pp 529-535

Tabony J., Vuillard L., Papaseit C.

Biological self-organisation and pattern formation by way of microtubule Reaction-Diffusion processes

Adv. Complex Systems (2000) **3**, pp 221-276

Taylor G. I.

Stability of a viscous liquid contained between two rotating cylinders

Phil. Trans. Roy. Soc. London A (1923) **223**, pp 289-343

Theraulaz G., Bonabeau E., Deneubourg J-L.

Les insectes architectes ont-ils leur nid dans la tête

La recherche (1998) **313**, pp 84-90

Thom R., Zeeman E. C.

Catastrophe theory: its present state and future perspectives

Dans A Mannign (Ed.) *Dynamical Systems*. Springer Verlag. (1974)

Thomas R., D'Ari R.

Biological feedback

CRC Press, Inc., 1990

Thompson W. *Sir D'Arcy*

(1917) *On growth and form*, Cambridge University Press.

Réédition version française (*Forme et croissance*), 1994, le seuil.

Tran P. T., Walker R. A., Salmon E. D.

A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends

J. Cell. Biol. (1997) **138**, pp 105-117

Turing, A. M.

The chemical basis of morphogenesis

Phil. Trans. R. Soc. Lond. (1952) **B237**, 37-72A

Tyson J., Alexander K., Manoranjan V., Murray J.

Spiral waves of cyclic AMP in a model of slime mold aggregation

Physica D (1989) **34**, pp 193-207

Ueno S., Iwasaka M.

Magnetic nerve stimulation and effects of magnetic fields on biological, physical and chemical processes

Biol. Eff. Magn. El. Fields, (1996), Ueno S. (Ed.), Plenum Press, New York

- Vandecandelaere A., Martin S. R., Bayley P. M.
Regulation of microtubule dynamics instability by tubuline-GDP
 Biochemistry (1995) **34:4**, pp 1332-1343
- Valles J. M., Lin Jr. K., Denegre J. M., Mowry K. L.
*Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*: toward low-gravity simulation*
 Biophys. J. (1997) **73**, pp 1130-1133
- Vassilev P. M., Dronzine R. T., Vassileva M. P., Georgiev G. A.
Parallel arrays of microtubules formed in electric and magnetic fields
 Bioscience Reports (1982) **2**, pp 1025-1029
- Vassy J., Portet S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafeve F., Karniguian A., Gasset G.,
 Irinopoulou T., Calvo F., Rigaut J.P., Schoevaert D.
The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7
 Faseb J. (2001) **15**, pp 1104-1106.
- Velarde M., Normand C.
Convection
 Scientific American (1980) **243:1**, pp 78–93
- Venier P., Maggs A. C., Carlier M-F., Pantaloni D.
Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations
 J. Biol. Chem. (1994) **269:18**, pp 13353-13360
- Mr. de Voltaire* [François-Marie Arouet], (1757)
Collection complète des Œuvres de Mr. de Voltaire – Première édition
 Tome 3, Mélanges de Philosophie avec des figures – *Éléments de philosophie de Newton*
 (a) Chapitre VIII "*Des premiers principes de la matière*" pp 59-60
 (b) Chapitre XI "*Action mutuelle des corps sur la lumière*", 3^{ème} partie, p261
- Vorobjev I. A., Rodionov V. I., Maly I. V., Borisy G. G.
Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover
 J. Cell Science (1999) **112**, pp 2277-2289
- Walker R. A., Inoué S., Salmon E. D.
Asymmetric behavior of selected microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro
 J. Cell. Biol. (1989) **108**, pp 931-937

Walker R. A., O'Brien E. T., Pryer N. K., Soboeiro M. F., Voter W. A., Erickson H. P., Salmon E. D.

Dynamic instability of individual microtubules analysed by video light microscopy : rate constants and transition frequencies

J. Cell. Biol. (1988) **107**, pp 1437-1448

Walker R. A., Pryer N. K., Salmon E. D.

Dilution of individual microtubules observed in real time in vitro: evidence that cap size is small and independent of elongation rate

J. Cell. Biology (1991) **114**, pp 73-81

Weisenberg R. C.

Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentration

Science (1972) **177**, pp 1104-1105

Weisenberg R. C., Deery W. J.

Role of nucleotide hydrolysis in microtubule assembly

Nature (1976) **263**, pp 792-793

Whitesides G. M., Ismagilov R. F.

Complexity in chemistry

Science (1999) **284**, pp 89-92

Zhabotinski A. M.

dans Frank, G. M., Ed., "*Oscillating processes in biological and chemical systems*", Science Publ. Moscow, (1967), p149

Publications Personnelles Relatives à ces Travaux

Glade N., Tabony J.

The effect on microtubule self-organisation of reduced gravity levels produced in ground based experiments; comparison with space flight experiments

J. Phys.IV, France (2001) **6**, pp 255-260

Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J.

The effect of gravity on microtubule self-organisation

J. Phys. IV France (2001) **11**, 239-246

Glade N., Demongeot J., Tabony J.

Comparison of reaction-diffusion simulations with experiment in self-organised microtubule solutions

C. R. Biologies (2002) **325**, pp 283-294

Tabony J., Glade N., Demongeot J., Papaseit C.

Biological self-organization by way of microtubule reaction-diffusion processes

Langmuir (2002) **18:19**, pp 7196-7207

Glade N., Demongeot J., Tabony J.

Numerical simulations of microtubule self-organisation by reaction-diffusion

Acta Biotheoretica (2002), **50:4**, pp 239-268

Tabony J., Glade N.

L'union fait la forme

(Titre originel : *Les origines de l'ordre dans le vivant: le cas des microtubules*)

La recherche (Nov. 2002) Hors Série N°9 "Ordre et désordre"

Tabony J., Glade N., Demongeot J.

Microtubule self-organization: a biological exemple of 'emergent' phenomena in a 'complex' system

Recent. Res. Devel. Biophys. Chem. (2002) **3**, pp 11-53

Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J.

Microtubule self-organisation and its gravity dependence

Advances in Space Biology and Medecine: Cell biology and biotechnology in space (2002), Elsevier Science, A. Cogoli (Ed.) **8**, pp 19-58.

Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J.

Gravity dependence of microtubule preparations
J. Gravitational Physiology (2002) **9**, pp 10-14

Tabony J., Glade N.

Auto-organisation biologique et structures hors-équilibre: l'exemple des microtubules
Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines. De la structure aux fonctions (2003) EDP
Sciences, pp 144-147

Demongeot J., Bézy-Wendling J., Mattes J., Haigron P., Glade N., Coatrieux J.-L.
Multiscale modeling and imaging: The challenges of biocomplexity
Proc. IEEE (2003) **91:10**, 1723-1737