



HAL
open science

La propulsion par polymérisation d'actine sondée par micromanipulation

Yann Marcy

► **To cite this version:**

Yann Marcy. La propulsion par polymérisation d'actine sondée par micromanipulation. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2003. Français. NNT : . tel-00005463

HAL Id: tel-00005463

<https://theses.hal.science/tel-00005463>

Submitted on 25 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.

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Par

Yann Marcy

Sujet :

**La propulsion par polymérisation d'actine
sondée par micromanipulation**

Soutenue le 18 Décembre 2003

Jury :

M Christian Auclair	Rapporteur
Mme Marie-France Carlier	
M Didier Chatenay	
M Albrecht Ott	
M Alexander van Oudenaarden	Rapporteur
M Jacques Prost	
Mme Cécile Sykes	Directeur

Remerciements

J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail : Christian Auclair et Alexander van Oudenaarden les rapporteurs ainsi que Marie-France Carlier, Didier Chatenay et Jacques Prost. Je suis reconnaissant à Albrecht Ott de m'avoir donné la chance d'effectuer mon stage de DEA puis le début de ma thèse au Laboratoire Physico-Chimie de l'Institut Curie. Son expertise dans de nombreux domaines m'a été extrêmement bénéfique. Suit au départ d'Albrecht en Allemagne, je suis allé traîner mes guêtres en Bavière. Je tiens à remercier Pramod Pullarkat et Margot Leinich qui y sont toujours pour leur extrême gentillesse. De retour à l'Institut Curie, Jacques Prost a su m'orienter vers une nouvelle équipe, ce en quoi je le remercie ainsi que pour les nombreuses et riches heures passées avec lui tant pour la théorie que pour le footing. Cecile Sykes m'a recueilli pour une nouvelle aventure. Je lui en suis éternellement reconnaissant. Ses qualités humaines et professionnelles m'ont permis de terminer ma thèse dans les meilleures conditions. Elle a su me donner les moyens, me motiver et encadrer ma recherche le tout dans la bonne humeur. Je tiens tout spécialement à remercier les personnes au laboratoire sans l'aide de qui mon travail n'aurait pu aboutir. Merci donc tout d'abord à Heckel et Jeckel (Axel Buguin et Pascal Silberzan). S'ils sont difficiles de prime abord (chaque réponse s'accompagne de sarcasmes) leur conseils m'ont été très précieux. Merci à Pascal Martin qui, non content d'être l'oreille du laboratoire à laquelle je me confie le plus souvent, a été décisif dans la mise au point de mon expérience. Merci à Sainte Julie Plastino pour son aide précieuse en biochimie mais surtout pour sa gentillesse et sa générosité. Je suis également reconnaissant à Anne Bernheim-Grosswasser qui m'a initié au sujet ainsi qu'à Sébastien Wiesner à Gif qui a toujours su remédier à mes problèmes biologiques. Je tiens à remercier Jean-François Joanny pour nous avoir donné le coup de pouce théorique qui a débloqué la fin de ma thèse. Merci aux mécaniciens Michel Petit et Gilles Rousseau qui ont toujours rattrapé mes ratés en mécanique. Je tiens à remercier l'équipe réseau qui m'ont sauvé maintes fois de catastrophes informatiques diverses et fréquentes. Merci au personnel administratif du laboratoire et notamment Brigitte Da Silva pour sa légendaire bonne humeur. Je me souviendrai avec nostalgie des vieux sous directeurs râleurs Patrick Keller et Jacques Malthête, pleins d'humour et de gentillesse. Enfin au cours de ces cinq ans passés au laboratoire, j'ai eu la chance d'interagir avec de nombreuses personnes avec qui j'ai pris plaisir à discuter, sérieusement ou non (le plus souvent) . Le liste est trop longue pour être déclinée mais qu'ils soient sûrs de ma reconnaissance et de mon attachement.

Je tiens à remercier mes amis ainsi que mon frère pour m'avoir entouré toutes ces années et avoir répondu présent.

Enfin j'adresse mes derniers remerciements à mes parents pour leur soutien sans faille et leur générosité.

Je dédie cette thèse à mes Grands-pères Gérard Marcy et Jean Courrat qui n'ont pas pu voir ce travail aboutir.

Table des Matières

Introduction	3
Première Partie : Traction cellulaire	9
I. Introduction.....	10
II. Matériel et méthodes.....	12
III. Traction d'un fibroblaste à force constante.....	25
Bibliographie.....	28
Deuxième partie : Propulsion par polymérisation d'actine	29
I. Introduction.....	30
I.1 Pathogènes et organites : de <i>Listeria monocytogenes</i> aux endosomes.....	30
I.2 La biochimie du mouvement.....	34
I.3 Les systèmes biomimétiques.....	39
I.4 Mesures physiques.....	41
I.5 Modélisation théorique.....	52
Bibliographie.....	65
II. Matériel et méthodes.....	67
Introduction.....	67
II.1 Principe du montage expérimental.....	67
II.2 Méthodes préliminaires à la préparation.....	72
II.3 Les poignées flexibles.....	78

II.4 Conditions et mises en place.....	89
Bibliographie.....	96
III. Résultats.....	97
III.1 Croissance d'une comète sur une poignées.....	98
III.2 Application d'une force.....	101
III.3 Caractérisation physique du système. Propriétés statiques.....	106
III.4 Croissance contre un obstacle flexible.....	110
III.5 Expérience à force constante et relation force vitesse.....	112
III.6 Instabilité dynamique de stick-slip.....	124
Bibliographie.....	130
Conclusion et perspectives.....	131

Introduction

Le développement de métastases est la première cause de mortalité des patients atteints d'un cancer (Woodhouse, Chuaqui et al. 1997). C'est un processus par lequel une cellule néoplasique quitte le site de la tumeur primaire pour envahir le tissu adjacent (**invasion**), pénètre dans les vaisseaux, nouvellement créés par **angiogénèse** (intravasation), circule puis ressort à un site distant (extravasation) pour générer une tumeur secondaire qui va se développer (**prolifération des métastases**). Si les thérapies ciblant la prolifération puis l'angiogénèse ont été utilisées avec succès au cours des dernières années, celles ciblant l'invasion ont une efficacité mitigée dans les cancers (Friedl and Wolf 2003). L'invasion requiert l'adhésion et la protéolyse locale de la matrice extracellulaire qui constituent les seules cibles thérapeutiques sur cette étape de la formation des métastases. Pourtant les étapes majeures de ce processus sont la **translocation** au travers de la membrane basale et de la barrière constituée par la matrice extracellulaire et la **migration** à travers le tissu envahi. Ces étapes principales ne sont, elles, pas la cible de traitement aujourd'hui (Liotta and Kohn 2001). La raison principale pour laquelle il est très difficile de mettre au point des drogues contre la translocation et la migration est que ce sont des processus physiologiques extrêmement répandus (Lauffenburger and Horwitz 1996). La migration intervient dans l'embryogenèse à de nombreuses reprises allant de la gastrulation au développement du système nerveux. Dans la réponse immunitaire elle permet le déplacement des leucocytes. Enfin lors de la cicatrisation, les fibroblastes utilisent cette migration pour atteindre le site à réparer. La plupart des cellules immunitaires utilisent la translocation pour passer des vaisseaux sanguins ou lymphatiques vers les tissus enflammés en passant à travers la barrière épithéliale. Il est alors impossible d'utiliser des drogues qui bloquent entièrement l'un ou l'autre (cela équivaldrait à manger une amanite phalloïde dont le poison, la phalloïdine est connue pour, entre autre, les arrêter complètement). Par contre, s'il était possible de les déstabiliser de manière spécifique, on pourrait réduire l'agressivité de certaines tumeurs. Pour cela, il est nécessaire d'appréhender comment des phénotypes mécaniques sont créés à partir de processus biochimiques.

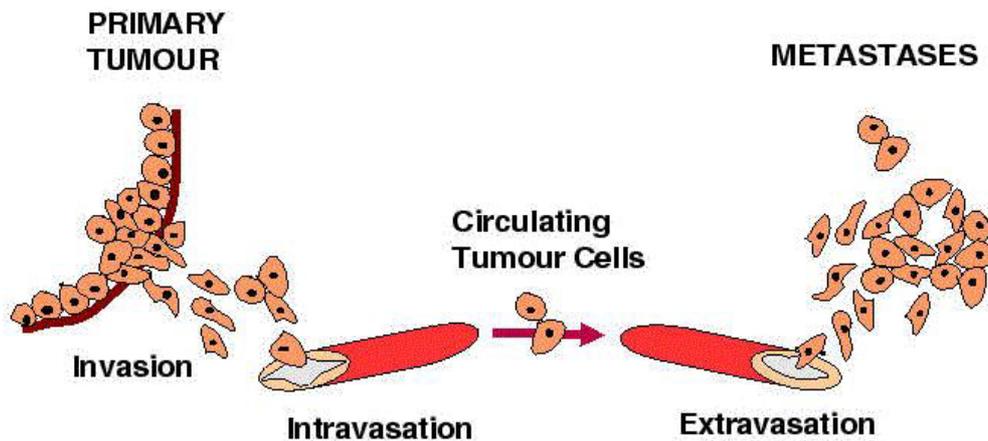


Figure 1 formation des métastases

Translocation et migration sont des phénomènes générés grâce à l'action d'une protéine ubiquitaire et extrêmement conservée chez les eucaryotes: l'**actine**. Cette protéine possède la propriété de s'auto assembler en filaments hélicoïdaux polaires (voir la figure 2a-b). L'étape limitante de l'assemblage est la nucléation d'un protofilament. C'est pourquoi la formation de filaments ne s'effectue qu'à partir d'une concentration critique d'actine monomérique. Dans les conditions physiologiques, les monomères d'actine sont liés à un ATP et un sel divalent et s'associent préférentiellement au bout barbé tandis que la dépolymérisation est plus forte au bout pointu. En régime stationnaire, les filaments ont une longueur moyenne constante mais les monomères sont renouvelés continûment comme l'illustre la figure 2c. Ce régime est nommé treadmilling. Les monomères sous forme ATP s'associent au bout barbé. Ils sont ensuite transformés en ADP-Pi puis en ADP suivant leur temps de vie dans le filament (équivalent à leur position). Ce processus de maturation consomme donc de l'énergie chimique dont une partie est dissipée. Ce n'est donc pas un équilibre thermodynamique. Le temps de renouvellement complet d'un filament, pour de l'actine pure, est bien inférieur à celui observé dans les cellules. Ce processus est donc catalysé par d'autres protéines que nous évoquerons plus tard dans ce manuscrit. A cet auto assemblage s'ajoute un niveau d'organisation supérieur. Les filaments d'actine s'associent à de très nombreuses protéines pour former des structures extrêmement variées dans les cellules eucaryotes. Les propriétés statiques de ces structures sont en grande partie responsables (en combinaison avec les autres protéines du cytosquelette comme les microtubules ou les filaments intermédiaires) de la tenue mécanique et de la forme des cellules. Les propriétés dynamiques de ces structures sont à l'origine de nombreux changements de morphologie et de mouvements cellulaires.

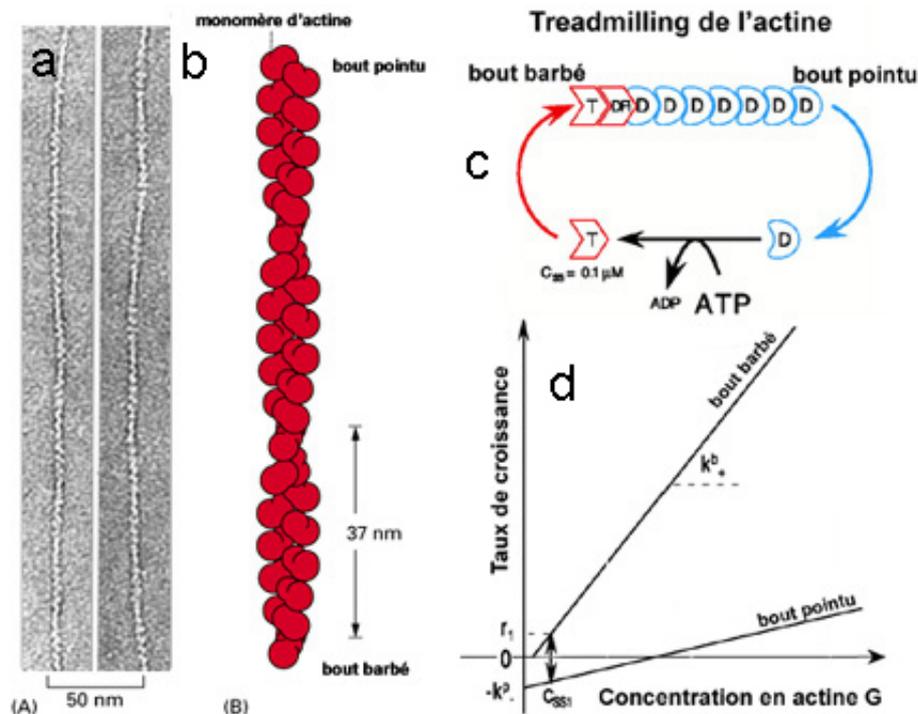


Figure 2 : Polymérisation de l'actine. a-b Filament d'actine en microscopie électronique (a) et schématisé (b). c : treadmilling de l'actine. c : taux de croissance d'un filament dans les conditions physiologiques. D'après (Pantaloni, Le Clainche et al. 2001).

La migration est essentiellement produite par la combinaison de deux de ces assemblages dynamiques. Sur un substrat plan, une cellule mésenchymateuse (qui a une capacité à migrer) est polarisée. L'avant de la cellule (dans le sens du mouvement) est une mince protrusion: le lamellipode. Il est essentiellement constitué de filaments d'actine structurés en un réseau dendritique branché comme l'illustre la figure 2c. Dans ce lamellipode, la polymérisation d'actine a lieu à la surface. Elle est dirigée vers la membrane de telle sorte que les nouveaux filaments poussent la membrane vers l'avant. A l'intérieur de la cellule se trouvent de gros câbles formé par des filaments d'actine appelés « bundles ». Dans ces structures se trouvent des myosines II, les moteurs moléculaires présents dans les muscles. L'analogie va même plus loin car ces câbles sont capables de se contracter grâce à l'interaction entre l'actine et la myosine. L'action combinée de ces deux structures à laquelle il faut ajouter l'adhésion au substrat permet la locomotion. En effet, l'avancée du lamellipode permet à la cellule d'étendre sa surface vers l'avant. Il y a alors une dissymétrie d'adhérence entre l'avant de la cellule et l'arrière dont la surface en contact est beaucoup plus petite. Lorsque les câbles d'actine se contractent, une force de traction s'exerce le long de l'axe du mouvement. Les points

d'adhérence situés à l'arrière étant moins nombreux, il ressentent une force plus grande suffisante pour les casser. L'arrière se détache donc du substrat et la cellule avance (la réalité est plus complexe notamment en raison de la présence d'un phénomène de maturation des contacts focaux adhésifs mais le principe reste le même).

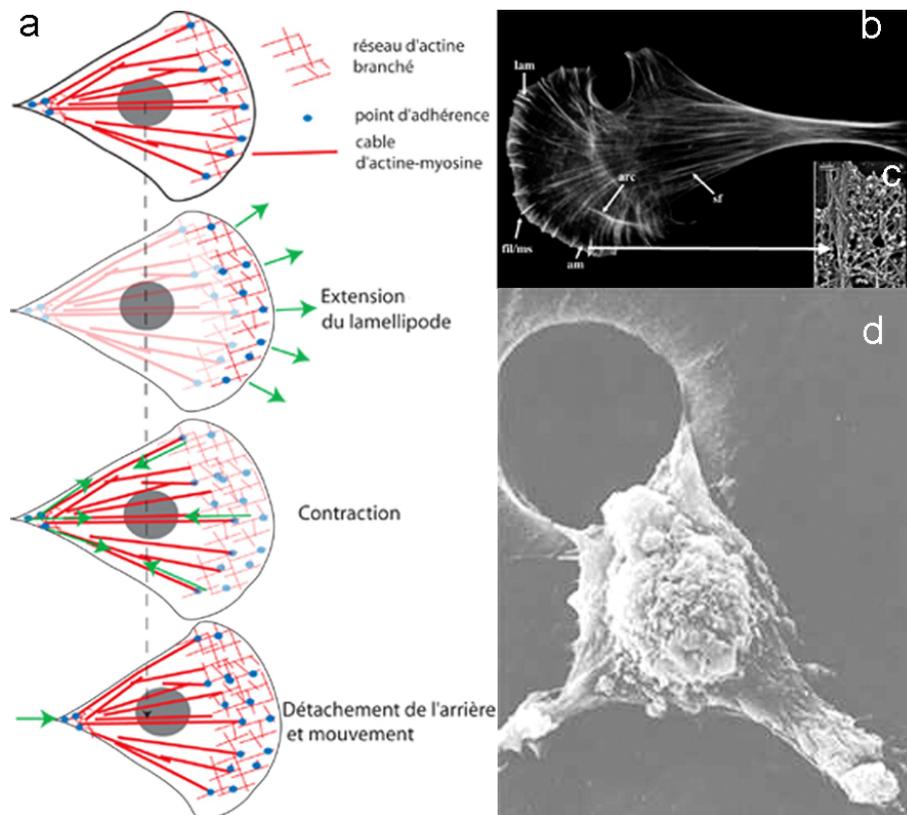


Figure 3: Motilité et translocation. a : schéma explicatif de la motilité d'un fibroblaste sur substrat à deux dimensions. b : image en fluorescence d'un fibroblaste motile dont l'actine est marquée. c : détails de l'organisation du cytosquelette dans le lamellipode. D'après (Small, Rottner et al. 1999). d : image de microscopie électronique à balayage d'un modèle de translocation d'un fibroblaste (site web de Liotta) .

Dans le cas de la motilité dans une matrice à trois dimensions la protrusion n'est plus un lamellipode mais un pseudopode cylindrique (Friedl and Wolf 2003). Le principe du mouvement reste le même puisque la polymérisation d'actine dirigée à la membrane du pseudopode permet l'extension vers l'avant de celui-ci et la contraction est similaire. La traction permet de la même manière à la cellule de se mouvoir, l'arrière étant arraché par les forces de traction sur les contacts adhésifs. La translocation est en cela très similaire à la migration à trois dimensions puisqu'elle utilise aussi un pseudopode qui va s'insérer dans l'interstice de la membrane basale, ménagé par protéolyse. Une fois que ce pseudopode adhère à la matrice extracellulaire, la traction permet à la cellule de se déplacer vers

l'extérieur de la tumeur. Un modèle de la translocation est illustré par la figure 3d. Le pseudopode est déjà engagé dans un trou pratiqué sur une surface et la traction commence à opérer.

Ainsi, dans les phénomènes de translocation et de migration, des structures d'actine sont à l'origine de la production de forces nécessaires au mouvement. Elles sont directement induites par la polymérisation dans le cas de la protrusion d'un pseudopode. Elles sont générées par l'interaction actine-myosine lors de la traction exercée par les câbles d'actine.

L'objet de l'étude présentée dans ce manuscrit est de caractériser ces deux types de force par micromanipulation. La première partie traite de la traction cellulaire étudiée grâce à une expérience d'étirement uniaxial sur fibroblaste unique. Dans la deuxième partie, nous avons caractérisé les forces produites par la polymérisation d'actine sur un système biomimétique du mouvement de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-74.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." Nature **411**(6835): 375-9.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, et al. (2001). "Mechanism of actin-based motility." Science **292**(5521): 1502-6.
- Small, J., K. Rottner, et al. (1999). "Visualising the actin cytoskeleton." Microsc Res Tech **47**(1): 3-17.
- Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, et al. (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8 Suppl): 1529-37.

Traction Cellulaire

I. Introduction

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre sur les forces et les mouvements dans les cellules, certaines cellules exercent des forces de traction au cours de processus physiologiques comme la migration. Par ailleurs, lors de la morphogénèse des tendons, les fibroblastes exercent une traction sur la matrice extracellulaire majoritairement composée de collagène pour mettre les tendons sous tension. Enfin, lors de la cicatrisation, les fibroblastes agissent de manière similaire pour refermer une plaie. Les mesures de traction sur des cellules étalées adhérentes à un substrat ayant vocation à migrer sont nombreuses tant au niveau local (par exemple (Heidemann 1999)) que cellulaire (ex : (Dembo 1996)). Mais vu leur vocation à migrer, il n'est pas possible d'isoler dans ces cellules le seul phénomène de traction. En revanche, il a pu être mise en évidence sur des fibroblastes dans une matrice collagène (Takakuda and Miyairi 1996) mais à l'échelle de la population de cellules ou à l'échelle de la cellule unique mais avec une mesure indirecte et non globale sur un support de PDMS (Fray 1998).

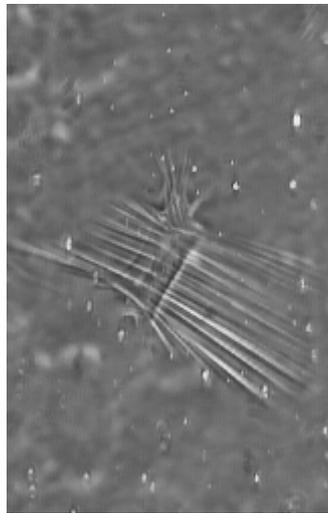


Figure 1 : Contraction d'un fibroblaste sur une matrice de PDMS. Les rides sont dues à la déformation du support sous la force (d'après Fray 1998)

Le but du travail effectué sous la direction d'Albrecht Ott à l'Institut Curie a été de mesurer la relation force-extension au cours du temps sur une cellule unique dans une géométrie proche de celle de cellules dans la matrice. On peut ainsi comprendre comment, en réponse à une

sollicitation globale, la cellule réorganise son cytosquelette pour résister à la déformation et exercer des forces en réponse. Pour cela un appareil d'étirement uniaxial de cellule unique avait été mis au point. Un fibroblaste est placé entre deux microplaques auxquelles il adhère grâce à un traitement chimique. L'une des microplaques, rigide, impose la déformation grâce à un déplacement contrôlé. L'autre, flexible, permet la mesure de la force proportionnelle à sa déflexion. De premières études effectuées par Olivier Thoumine ont permis de montrer qu'en réponse à une déformation, un fibroblaste a une réponse viscoélastique passive à court terme (4-5min) puis une réponse contractile active (ATP dépendante) aux temps longs (40min) (Thoumine and Ott 1997; Thoumine 1999). A ce point, les paramètres force et extension étaient couplés et il n'était pas possible d'imposer l'un et de mesurer l'autre en temps réel. D'autre part, l'expérience ne s'effectuait pas dans les conditions physiologiques de température ce à quoi la machinerie cellulaire (notamment le cytosquelette) est sensible. Ce travail a été alors été repris en 1999 par Joachim Spatz et Alexandre Micoulet. Le but du développement était d'être capable de mesurer l'extension (ou la force) en réponse à une force (resp. un extension) imposé par une rétroaction le tout à une température contrôlé (37°C). Pour cela, la mesure en temps réel de la force est réalisée à l'aide d'un fibre optique posée contre la microplaque flexible dont la déflexion est mesurée en détectant la position du spot laser en sortie de fibre. Cette position est corrigée en agissant sur un piézoélectrique solidaire de la microplaque rigide. On peut alors mesurer l'extension associée à cette force imposée (ou vice versa). L'expérience a été isolée dans une boîte dont la température est régulée à 37°C. Les deux premières années de ma thèse ont consisté à continuer le développement de cet appareil dans les axes suivants:

- Augmenter la reproductibilité de fabrication des microplaques.
- Augmenter la précision de la mesure et du contrôle en changeant l'ensemble de l'électronique, de la détection optique et une partie du programme de pilotage.
- Réduire les dérives thermiques en modifiant la majeure partie du montage mécanique de micromanipulation.
- Réaliser des mesures d'extension à force imposée.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Montage expérimental.

Le schéma de l'expérience est représenté sur la figure 2. L'ensemble du dispositif est placé sur une table anti-vibration. Sur cette table repose une chambre thermostatée isolée de l'extérieur par du polystyrène dans laquelle une ouverture en plexiglas est aménagée. Le contrôle de température est assurée par un contrôleur PID relié à un thermocouple et à des fils résistifs chauffants placés dans la chambre (non visibles sur le schéma). A l'intérieur de cette chambre se trouve le montage de traction proprement dit à l'exception du laser, de la caméra et du dispositif de détection du laser. Sur la platine du microscope sont fixés trois micromanipulateurs qui servent à manipuler respectivement les deux microplaques et la fibre optique (manipulateur non visible sur le schéma). Le manipulateur de microplaque rigide est solidaire d'un déplacement piézoélectrique qui permet de déplacer cet objet avec une précision d'une dizaine de nanomètres environ. Les microplaques et la fibre sont plongées dans un récipient contenant le milieu et les cellules. Leur disposition est illustrée sur le schéma du moniteur. Le faisceau d'un laser Hélium Néon (632.8nm) se propage au travers de la fibre optique. Le point lumineux en sortie de fibre est imagé par l'objectif (40X à eau, 1.2). Le faisceau résultant est dévié par un miroir dichroïque filtré par un filtre interférentiel (632nm) puis focalisé par une lentille sur un détecteur PSD à 2 dimensions. Le signal provenant du détecteur est amplifié et traité analogiquement puis le signal résultant est mesuré par une carte d'acquisition montée sur un premier ordinateur (PC). Ce signal est ensuite traité par un programme Labview qui en déduit la force (proportionnelle à la déflexion) et envoie un signal de correction, via la carte d'acquisition, au déplacement piézoélectrique. Les images sont acquises par une camera CCD refroidie (Micromax, Ropper) reliée à un deuxième ordinateur (Mac) qui ne traite que la prise d'image.

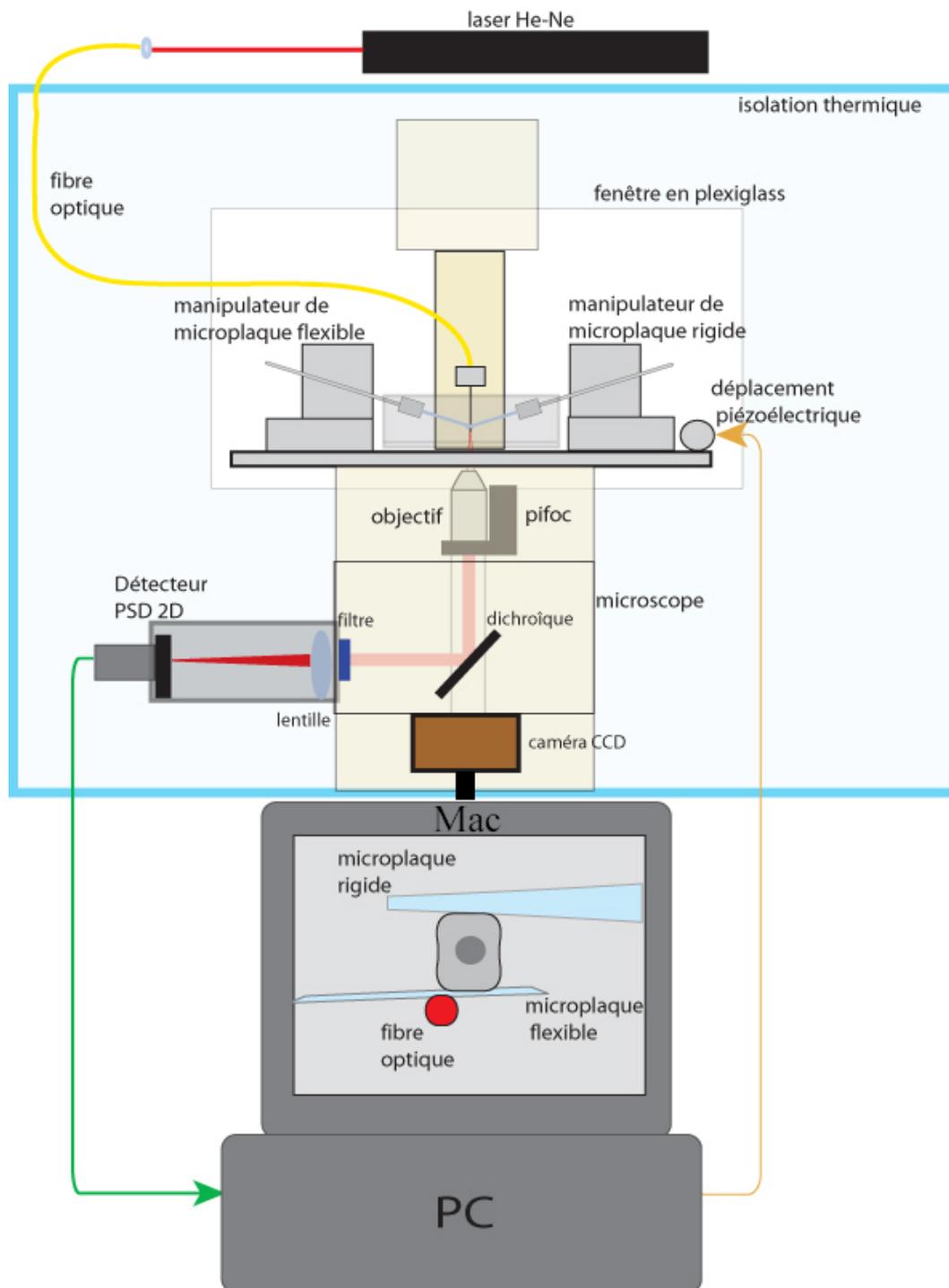


Figure 2 : Schéma du montage expérimental de traction cellulaire

II.2 Microplaques

Les microplaques sont les outils qui servent à micromanipuler les cellules. Elles sont étirées à partir de rubans de verre borosilicate, calibrée (pour la microplaque flexible) et enfin traitées chimiquement pour les rendre adhérentes aux cellules.

II.2.1 Fabrication

Les rubans de verre utilisés proviennent de la société Vitrocom qui les fabrique à façon. Il y a deux types de rubans suivant que l'on veut fabriquer des microplaques rigides (rubans épais) ou flexibles (ruban fin). Leurs dimensions sont 100mm de longueur, 1mm de largeur et 0,2mm d'épaisseur pour les rigides et de 100*1*0,075mm pour les flexibles. Les microplaques rigides sont fabriquées par étirage dans une étireuse à filament (P97 Sutter) spécialement modifiée. Les pipettes sont habituellement fixées sur les barres de traction de l'étireuse par serrage contre une rainure en V. Pour pouvoir étirer les microplaques ces barres ont été fraisées afin d'obtenir une surface plane sur laquelle le ruban de verre est serré. Les rubans sont ensuite étirés avec des paramètres différents suivant le type de ruban.

II.2.1 Calibration

La raideur des microplaques flexibles est calibrée grâce à des pointes d'AFM (Elexscience). Ces pointes sont montées sur des petits rectangles qui possèdent 7 cantilevers de taille différente. Celui utilisé est le plus long. Il se présente sous la forme d'un triangle formé de deux poutres de 200 μ m qui se joignent. Au sommet de ce triangle se trouve une pointe en forme de pyramide perpendiculaire aux poutres. La raideur de ce cantilever est située entre 10 et 50nN/ μ m. Il est nécessaire de la mesurer avec précision. Ceci est effectué sur le montage d'AFM du Laboratoire par Olivia Du Roure. La fréquence de résonance est déterminée en envoyant une tension sinusoïdale de fréquence variable à une céramique piézoélectrique solidaire du support du cantilever. Lorsque la fréquence d'excitation correspond à la fréquence de résonance, la réponse du cantilever est maximale. La raideur est calculée à partir de la fréquence de résonance en assimilant la pointe à deux poutres en parallèle. Une fois calibré, le rectangle qui supporte la pointe est collé sur un ruban épais lui-même monté sur le micromanipulateur qui comporte le déplacement piézoélectrique. La microplaque flexible est montée sur le micromanipulateur opposé. Le principe de la calibration consiste à pousser la pointe d'AFM contre la microplaque et de mesurer sa déflexion. La pointe est appuyée contre

la microplaque puis son support est déplacé en envoyant une tension au piézo. La déflexion de la pointe est mesurée par traitement d'images en utilisant le logiciel Iplab. La déflexion d est tracée en fonction du déplacement imposé D et la pente de la droite obtenue permet de connaître la raideur de la microplaque d'après la formule $K_{AFM}(D-d)=K_{mp}d$ qui rend compte de l'égalité des forces. L'erreur obtenue est typiquement de 20%. Elle provient de l'erreur sur la mesure de rigidité du cantilever lui-même et de l'erreur liée à la mesure de déflexion. Les raideurs mesurées varient entre 2 et 10nN/ μ m.

II.2.3 Traitement des microplaques

Les cellules doivent adhérer aux microplaques en un temps court (plus faible que le temps de sécrétion de matrice par les cellules elles mêmes). Par ailleurs, étant donné l'ordre de grandeur des forces appliquées, il est nécessaire d'avoir une adhésion forte. Les techniques de greffage de protéines n'étant pas bien maîtrisées lorsque cette étude a commencé, un greffage non spécifique chimique covalent a été préféré. Il est réalisé en attachant du glutaraldéhyde au verre des microplaques par le biais d'un silane aminé fixé au verre. Le glutaraldéhyde effectue des pontages covalents entre les amines et permet ainsi de faire la liaison entre le silane et les protéines qui possèdent de nombreux résidus aminés. Le traitement se fait donc en deux étapes : une silanisation et un traitement au glutaraldéhyde.

II.2.3.a Silanisation

- La surface du verre est nettoyée en utilisant un mélange appelé Piranhia composé de 50% de d'acide sulfurique et de 50% d'eau oxygénée.
- Les microplaques sont ensuite rincées avec de l'eau MilliQ.
- Elles sont ensuite trempées dans une solution de 2% de 3-aminopropyltriethoxy silane, 8% d'eau MQ et 90% d'éthanol absolu pendant environ 1h30. Durant ce temps, la fonction éthoxy réagit avec les résidus SiO_2 du verre pour former une liaison covalente Si-O-Si .
- Les microplaques sont ensuite rincées à l'éthanol et séchées à l'argon puis stockées dans une atmosphère sèche (le silane est sensible à l'eau).

II.2.3.b Traitement au glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde étant peu stable, il est nécessaire d'effectuer cette opération juste avant l'expérience. Elle consiste simplement à plonger les microplaques silanisées dans une solution à 2% en glutaraldéhyde pendant une heure puis de les rincer à l'eau.

II.2.3.c Adhésion spécifique avec des protéines.

Le glutaraldéhyde se fixant à toute les protéines, il est nécessaire lorsque l'on colle une cellule d'utiliser du milieu sans sérum (riche en facteurs de croissance protéiques). On doit l'ajouter après collage et on ne sait pas si cela va créer un régime transitoire de l'état de la cellule qui perturbera le comportement durant les expériences. L'utilisation de protéines d'adhésion spécifique de la matrice extracellulaire comme la laminine ou la fibronectine permet d'éviter ce problème. D'autre part, cela permet de se rapprocher des conditions physiologiques de l'adhésion au cours de laquelle se produit un renforcement du cytosquelette. Différents protocoles existent pour recouvrir le verre de ce genre de protéine. Il est possible d'utiliser un silane bifonctionnel (technique utilisée par Pierre Nassoy au Laboratoire) ou simplement d'adsorber les protéines comme dans certaines études (Riveline 2001). Toutefois, ce type d'approche n'a pu être utilisé par manque de temps.

II.3 Fibre optique

La fibre optique est utilisé pour détecter optiquement la déflexion de la microplaque flexible. Pour réaliser cette fonction, elle matérialise un point source de lumière solidaire de cette microplaque. Pratiquement, la fibre optique est affinée pour lui donner une rigidité très faible et est appuyée contre la microplaque.

II.3.1 Préparation de la fibre

La fibre utilisée est une fibre monomode de 125 μ m de diamètre possédant un cœur de 4 μ m (Corning P1-3224) Pour la rendre flexible, nous avons utilisé la technique décrite par Cluzel et coll. (Cluzel 1996). Elle consiste à plonger une fibre optique dans une solution d'acide fluorhydrique. L'acide ronge le verre (ou le quartz) de manière homogène et réduit le diamètre pour en faire une microfibre flexible. Dans notre cas, elle doit avoir une rigidité suffisamment faible pour ne pas perturber la mesure de force. Pour cela, il faut réduire le diamètre D de la fibre au maximum mais sans descendre jusqu'à la taille du cœur sans quoi la

lumière ne se propage plus et se perd sur toute la partie effilée de la fibre. Il faut donc aussi jouer avec la longueur L en tenant compte de la relation qui donne la rigidité k :

$$k = \frac{3E\pi(D/2)^4}{4L^3} \text{ où } E \text{ le module d'Young vaut } 75.10^9 \text{Pa.}$$

Le diamètre choisit varie entre 6 et 8 μm pour une longueur de 1,5 à 1,8cm. La rigidité obtenue varie entre 4 et 7 $\mu\text{N/m}$, et donc inférieure d' 1% à celle des microplaques.

Pratiquement, les opérations à effectuer sont les suivantes :

- enlever la gaine de la fibre sur environ 5cm,
- cliver la fibre. Cette opération est essentielle pour obtenir un clivage perpendiculaire à l'axe optique sans quoi la lumière ne sort pas dans cette direction,
- plonger la longueur voulue ($\sim 1,5\text{cm}$) dans du HF 60% pendant 30mn environ,
- fixer la fibre sur un porte fibre qu'on peut ensuite placer sur un micromanipulateur.

II.3.2 Montage optique

L'essentiel du montage optique est représenté sur la figure 2. Un faisceau laser est envoyé dans la fibre. L'extrémité de celle-ci est un point source dans le plan focal objet du microscope. Ce point source est ensuite conjugué à un détecteur 4 cadrans qui permet de mesurer la position de la fibre. Un laser Hélium-Néon est aligné avec un lentille convergente qui focalise le faisceau dans le cœur de la fibre (pigtailing). L'objectif récolte la lumière diffusée en sortie de la fibre dont le cœur se comporte comme un point source et la transforme en un faisceau parallèle. Ce faisceau est ensuite récupéré sur une sortie du microscope puis focalisé par une lentille sur un PSD (position sensitive detector) 2 dimensions pour en détecter la position.

II.4 Détection et pilotage

Le détecteur PSD fournit la position du spot laser et donc la déflexion de la microplaque. Cette position est corrigée grâce à un programme de rétroaction qui calcule le déplacement à appliquer au piézoélectrique solidaire de la microplaque rigide.

II.4.1 Mesure et génération des signaux

Les signaux d'entrée/sortie sont mesurés/générés par une carte d'acquisition National Instruments. Cette carte est pilotée à l'aide du logiciel Labview lui aussi de National Instruments. Les signaux d'entrée sont les coordonnées de position du détecteur (voir paragraphe suivant), et les signaux de mesure de température. Les signaux de sortie sont la tension de commande du piézoélectrique et des commandes digitales pour allumer ou éteindre la lampe du microscope par exemple. La tension de commande du piézoélectrique est une tension comprise entre 0 et 10V qui est envoyée à un amplificateur haute tension qui fournit la tension nécessaire au déplacement de la céramique.

II.4.2 Détection de la position

Le détecteur utilisé est un PSD à 2 dimensions de type « pincushion ». Lorsqu'un point lumineux arrive sur le PSD, une charge électrique proportionnelle à l'énergie lumineuse est créée à la position d'incidence. Cette charge est déplacée par une différence de tension appliquée entre les électrodes à travers une couche de semiconducteur dopé P et collectée par les électrodes. Comme la résistivité de la couche est uniforme, le photocourant collecté est inversement proportionnel à la distance parcourue entre la position incidente et l'électrode. Deux jeux d'électrodes perpendiculaires s'étendent sur tout un coté du détecteur de sorte que deux champs électriques perpendiculaires et uniformes sont créés et l'ensemble des photoélectrons récupérés. Les coordonnées de la position d'incidence se déduisent directement de la valeur des courants comme le montre l'équation de la figure 3 .

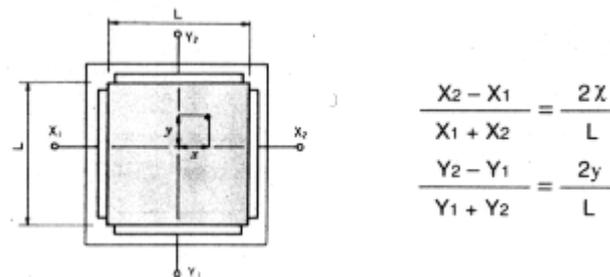


Figure 3 : Détection de position sur un PSD à deux dimensions carré.

Le détecteur utilisé dans cette expérience n'est pas exactement celui représenté sur la figure 3 car pour obtenir une meilleure linéarité du détecteur, la géométrie et le calcul des coordonnées sont différents mais le principe est le même. En sortie de ce détecteur, les quatre courants sont d'abord convertis en tension par un circuit amplificateur convertisseur courant tension. Les

tensions sont ensuite traitées analogiquement par un circuit qui effectue les opérations d'addition/soustraction et de division nécessaires pour obtenir les valeurs des coordonnées x_0 et y_0 . L'opération s'effectue après amplification/conversion pour une meilleure immunité au bruit. Il est à noter qu'étant donné que les valeurs des courants (ou des tensions) sont normalisées par la somme, le signal de position ne dépend pas de l'intensité lumineuse. On aboutit finalement à deux tensions x_0 et y_0 qui représentent les coordonnées de la position dans le repère du détecteur et qui sont envoyées en entrée de la carte d'acquisition. Il faut maintenant effectuer une calibration dans le système de coordonnées de l'expérience dont l'axe principal est déterminé par l'axe de déplacement du piézoélectrique. Pour ce faire, une fibre non rongée est placée sur le micromanipulateur doté du piézoélectrique. On place le cœur de la fibre au centre de l'image. En incrémentant la tension envoyée au piézoélectrique, on déplace le point lumineux sur une droite et on mesure les signaux x et y entre chaque point. La droite que l'on a décrite est une droite d'équation $x=cte$ dans le repère du microscope (x,y) . On peut maintenant calculer la matrice de rotation qui permet de passer du repère (x_0,y_0) au repère (x,y) . Par ailleurs, si l'on trace la droite $(x_0^2+y_0^2)^{1/2}=f(y)$, la pente donne la correspondance entre Volts et microns. L'origine du repère n'est pas importante car dans les expériences, on ne se soucie que des distances à une position initiale repérée en début d'expérience.

II.4.3 Contrôle de la force appliquée

Le but du montage est d'imposer une force (ou une extension). Cette opération s'effectue grâce à un programme écrit avec Labview qui effectue une boucle de rétroaction. Cette boucle de rétroaction consiste à comparer la force mesurée avec la force à imposer. Si la différence entre ces deux quantités est plus grande que la précision voulue, la position de la microplaque rigide, solidaire du piézoélectrique, est corrigée. Pratiquement (voir figure 4), les signaux du PSD sont acquis à une fréquence de 10kHz. Le programme fait ensuite une moyenne sur 1000 points de chacun des signaux. La distance entre la position initiale à force nulle et la position à cet instant est calculée. Cette position est convertie, en la multipliant par la rigidité de la microplaque flexible utilisée, en une force qui est comparée à la contrainte. Si la valeur absolue de ce résultat est supérieure à la précision spécifiée (0,1nN), l'incrément correctif est affecté du signe de cette comparaison puis ajouté à la précédente position du piézoélectrique. La fréquence de cette boucle est de l'ordre de 4Hz. L'erreur statistique sur la force est de l'ordre de 10nm (voir figure 5).

pour optimiser la stabilité du chauffage. Le problème majeur de la régulation de température réside dans le fait que pour mettre en place l'expérience, il est nécessaire d'ouvrir la chambre par la fenêtre de plexiglas. Cette ouverture entraîne une chute de la température que le contrôleur doit compenser. Lorsque la chambre est refermée, le retard de la correction entraîne une surchauffe. Le système met un temps très long à se stabiliser (plus de 20mn) ce qui est rédhibitoire pour l'expérience car pendant ce temps la cellule est déjà en place.

II.5.2 Dérives thermiques

L'inconvénient majeur de la variation de température est l'existence de dérives thermiques qui lui sont associées et qui entraînent des erreurs de mesures. Ces dérives sont de deux types. Un premier type provient de la dilatation des composants mécaniques qui supportent l'optique du microscope et provoque notamment un déplacement des miroirs internes. Les microscopes ont été optimisés pour travailler dans des températures homogènes. Mais l'ouverture de la chambre impose des gradients thermiques qui ne sont pas compensés. Il est très facile de s'en rendre compte si l'on prend un séchoir à cheveux et qu'on l'applique à la base d'un microscope inversé. Si l'on place la fibre optique et que l'on mesure sa position à l'aide du détecteur, on peut observer une dérive très rapide qui peut être de plusieurs dizaines de microns. Cette dérive n'est pas la plus gênante car sa constante de temps est faible et on peut donc se permettre d'attendre la stabilisation. Pour réduire encore plus la constante de temps, la consigne de température a été mise à 33°C lorsque l'ouverture est effectuée puis remise à 36°C à la fermeture (une consigne de 36°C donne une température mesurée avec un sonde PT100 de 37,2°C). Cette modification permet d'éviter la surchauffe du système et diminue le temps de stabilisation. La réponse en température est tracée sur la figure 6.

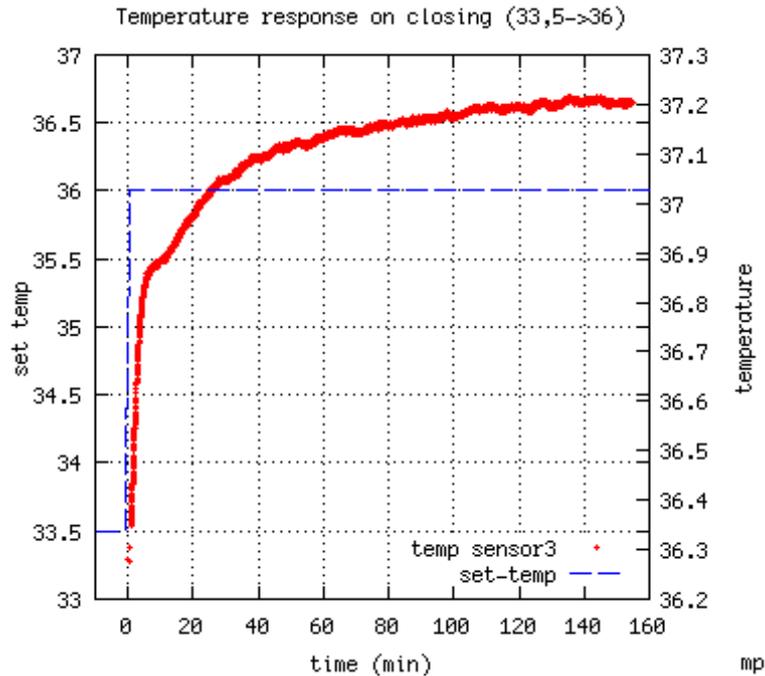


Figure 6 : Réponse du chauffage à la fermeture

Par contre, le deuxième type est plus problématique. Il s'agit d'une composante qui provient de l'assemblage de micromanipulation, de la platine du microscope au porte microplaque. Outre la dilatation globale due à des effets en volumes, s'ajoute un effet d'interface. S'il y a un contact entre deux métaux différents, la différence de coefficient de dilatation induit des contraintes qui peuvent relaxer par une courbure des pièces ou un déplacement relatif (effet bimorphe illustré en figure 7). Ce type d'effet peut s'ajouter tout au long du chemin mécanique pour aboutir à une dérive des microplaques qui sont en bout de chaîne. Par ailleurs, la fixation des microplaques est critique à cet égard puisque la microplaque est fixée entre deux plaques d'aluminium. L'ensemble des dérives de la chaîne d'assemblage a une constante de temps très longue (de la dizaine de minutes à l'heure). Aussi il n'est pas question d'attendre que la chambre se soit stabilisée pour réduire l'effet de ce terme. Le seul moyen de résoudre ce problème est de réduire au maximum ces effets en modifiant le montage mécanique. C'est ce qui a été tenté durant ce travail. L'ensemble du montage a été refait de telle manière à n'utiliser qu'un matériau (dural) en minimisant les interfaces. On peut signaler que ce phénomène a maintenant été résolu par l'équipe d'Albrecht Ott à Bayreuth en confinant le chauffage à la seule cellule d'expérience.

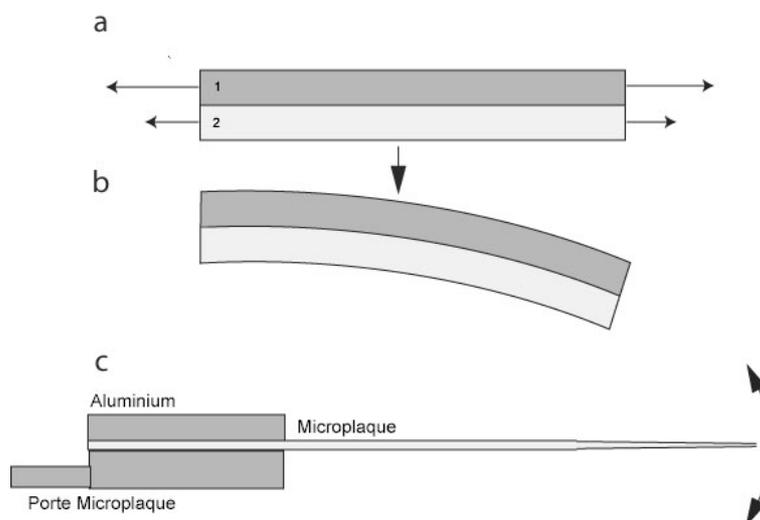


Figure 7 : Effet bimorphe dans un assemblage de deux matériaux. a : dilatation différentielle entre les matériaux 1 et 2. b : effet bimorphe. c : influence sur la fixation des microplaques.

II.6 Culture Cellulaire

Les cellules utilisées lors des expériences sont des fibroblastes Swiss 3T3 transfectés de manière stable par une construction actine-GFP sous contrôle d'un promoteur activé par la gentamicine (un antibiotique). Comme leur nom l'indique, il faut s'en occuper tous les trois jours, ce qui en fait un objet sympathique pour les physiciens. La culture s'effectue dans un milieu nommé DMEM avec un protocole très classique. Dans leur état « physiologique », les fibroblastes adhèrent au substrat et se divisent. Une fois que la couche de cellule arrive à confluence c'est-à-dire que les cellules se touchent, il faut décrocher les cellules, en prélever une petite partie et les remettre dans une nouvelle flasque où elles commenceront de nouvelles divisions. Pour décrocher les cellules, on procède en deux étapes. On remplace tout d'abord le milieu de culture par un tampon qui ne contient pas de Ca^{++} ni de Mg^{++} . Ces ions interviennent dans l'adhésion des cellules entre elles (en se liant aux cadhérines) ou sur le substrat (en se liant aux intégrines). Les adhésions intermoléculaires sont alors déstabilisées. On ajoute de la trypsine qui est une enzyme qui clive les protéines sur un motif spécifique courant. On détruit ainsi majoritairement les liaisons à la matrice extracellulaire sécrétée par les fibroblastes. Il est important de ne pas laisser les cellules trop longtemps dans la trypsine pour ne pas détruire toutes leurs protéines de surface. Grâce à cette opération, les cellules se décrochent après un léger tapotement. Une goutte de la solution obtenue est ensuite introduite dans une nouvelle flasque et diluée dans du milieu auquel on ajoute du sérum qui contient les facteurs de croissance nécessaires à la division. Lorsque l'on veut effectuer une expérience,

l'action de la trypsine devient gênante car une proportion non négligeable des protéines de surface a été détruite, ce qui nuit à l'adhésion rapide sur les fibroblastes. On utilise donc une autre stratégie. Elle consiste à remplacer la trypsine par un réactif qui contient notamment un chélateur du Calcium (Cell Dissociation Buffer) qui va séquestrer tous les ions calcium engagés dans des liaisons adhésives et les rompre. Il faut par contre taper plus fermement la surface pour détacher les cellules. Les cellules obtenues sont alors placées dans un milieu sans sérum jusqu'à ce qu'elles soient utilisées. En solution, les fibroblastes ont une forme ronde ce qui indique que les fibres de stress formées lors de l'adhésion ont disparu.

III. Traction d'un fibroblaste à force constante

III.1 Mise en place

Avant d'effectuer l'expérience de traction proprement dite, il faut attraper une cellule et la disposer entre les microplaques puis placer la fibre contre la microplaque flexible. Les microplaques sont trempées dans le glutaraldéhyde 1h avant l'expérience. 15 minutes auparavant, les cellules sont resuspendues. Le temps devient alors très important. La chambre qui contient le montage expérimental est ouverte et la consigne de température est abaissée à 33,5°C. Les microplaques sont montées sur leurs micromanipulateurs respectifs et introduites dans le récipient rempli de milieu sans sérum puis placées dans le champ du microscope. La microplaque rigide est disposée avec sa largeur parallèle au plan focal et la microplaque flexible avec sa largeur perpendiculaire. La microplaque rigide est placée proche de la surface, au centre de l'image. Une goutte de la solution contenant les cellules est ensuite déposée dans le récipient. Les cellules tombent vers le fond et ralentissent à l'approche de la surface. En observant au microscope, on repère une cellule qui tombe et on vient placer la microplaque rigide en dessous de manière à ce que la cellule tombe sur l'extrémité. Une fois en contact avec la surface de la microplaque, la cellule commence à adhérer. En bougeant doucement la microplaque, on vérifie que la cellule est bien collée et on tourne ensuite le porte microplaque de 90 degrés sur lui-même de manière à placer la microplaque rigide parallèle à la flexible, la cellule en regard de celle-ci. On vient ensuite placer la fibre optique dans la solution et on vient l'appuyer contre la microplaque flexible. On mesure alors la position initiale du spot qui donnera le zéro de la force. Ensuite, à l'aide du piézoélectrique, on déplace la microplaque rigide pour mettre en contact la cellule avec la microplaque flexible. Une fois le contact établi, repérable en suivant l'inflexion de la courbe de position tracée en temps réel, on applique un déplacement de manière à comprimer la cellule et favoriser ainsi une adhésion efficace. On attend ensuite quelques minutes avant de lancer l'expérience de traction pour laisser le temps à la cellule d'adhérer. Pendant ce temps, on introduit éventuellement le sérum. Durant ces étapes où les perturbations peuvent être fortes, la fibre qui est instable quitte très souvent sa position. Il faut alors la replacer après adhésion. Le zéro n'est donc plus assuré.

C'est pourquoi il est nécessaire de prendre une image avant contact qui servira le cas échéant à calculer la correction à appliquer à la déflexion.

III.2 Traction et Mesure

Le principe de la mesure est d'appliquer une force constante en traction à la cellule et de mesurer son extension. Après quelques minutes, une rampe de force est imposée (de 0 à 20nN dans le cas de la figure 8). Cette force est ensuite maintenue grâce à la rétroaction pendant environ une heure. L'extension de la cellule est la différence entre la distance parcourue par la microplaque rigide et la déflexion de la microplaque flexible. Sur la figure 8 est représenté une telle expérience. La séquence d'image montre la cellule adhérent entre les deux microplaques. La fibre est disposée contre la microplaque flexible à droite de la cellule comme cela est indiqué sur la figure 8. La courbe correspondante est tracée sous la séquence. Lorsque la force augmente, la cellule est étirée jusqu'à une extension de $3,5\mu\text{m}$. Il s'agit d'un processus viscoélastique passif. Elle commence ensuite à se rétracter lorsque la force est constante pour aboutir à une extension de $-3\mu\text{m}$. Dans cette partie de l'expérience, la cellule produit une force de traction qui s'oppose à la force imposée et qui lui est supérieure ce qui provoque cette rétraction. La forme de la cellule reste convexe ce qui indique que la membrane n'est pas sous tension. C'est donc sûrement le cytosquelette à l'intérieur qui est responsable de cette traction active. Par ailleurs, on peut observer que deux lamellipodes se forment de part et d'autre de la cellule à des côtés opposés et avancent le long de leur microplaque respective pour se stabiliser. Ils participent sûrement à la traction en tirant chacun d'un côté.

III.3 Remarques

Ce résultat est à considérer avec précaution puisque des dérives thermiques subsistaient. D'autre part, le processus dépend beaucoup de la surface d'adhésion de la cellule. En effet, si l'on comprime plus la cellule, la surface de contact est supérieure et lors de la traction, la forme de la cellule devient concave (voir la figure 9). La membrane subit donc une plus grande tension. Enfin, avec ce type de culture cellulaire, les cellules sont à des étapes du cycle différentes. On ne sait pas a priori dans quel cycle se situe celle que l'on soumet à la traction. Il serait donc nécessaire de synchroniser les cellules.

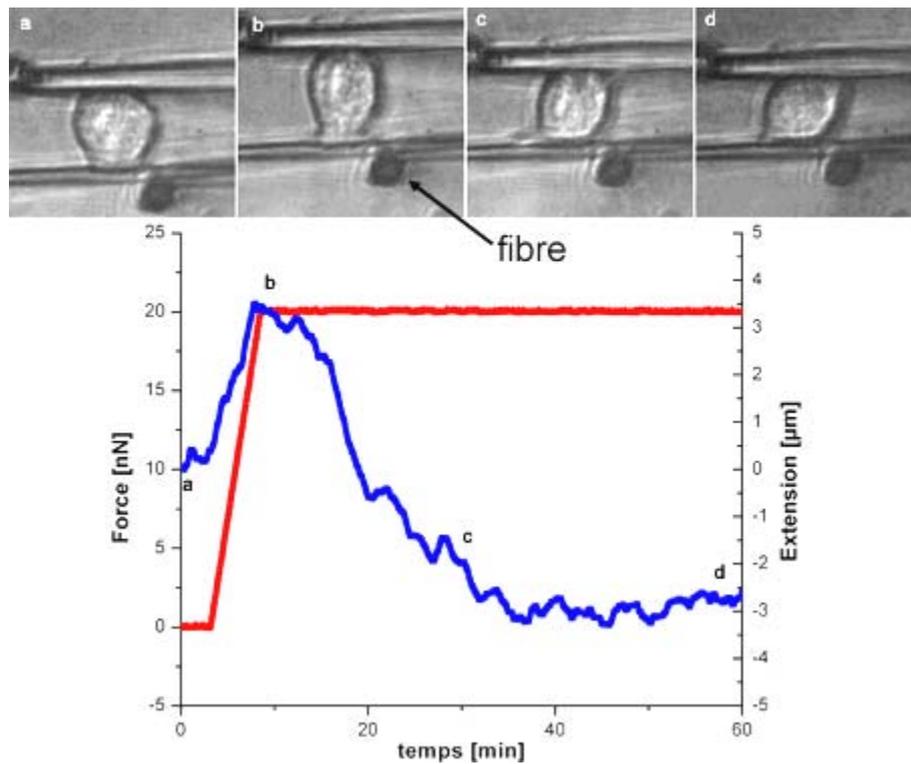


Figure 8 : Expérience de mesure de l'extension d'une cellule à force constante. La force est en rouge et l'extension en bleu. Les images correspondent aux repère (a,b,c,d) sur la courbe.

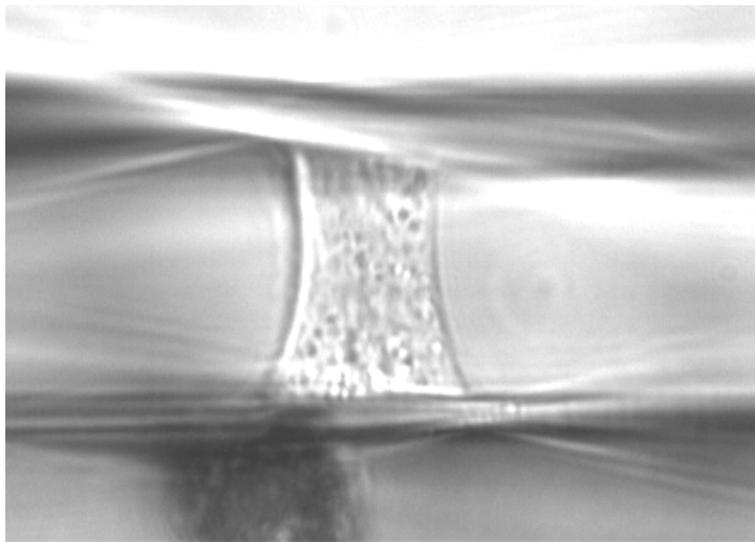


Figure 9 : autre condition de traction : forme concave

-
- Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, Chatenay D, Caron F. 1996. DNA: an extensible molecule. *Science* 271(5250):792-4.
- Dembo M, Oliver T, Ishihara A, Jacobson K. 1996. Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophys J* 70(4):2008-22.
- Fray TR, Molloy JE, Armitage MP, Sparrow JC. 1998. Quantification of single human dermal fibroblast contraction. *Tissue Eng* 4(3):281-91.
- Heidemann SR, Kaech S, Buxbaum RE, Matus A. 1999. Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J Cell Biol* 145(1):109-22.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153(6):1175-86.
- Takakuda K, Miyairi H. 1996. Tensile behaviour of fibroblasts cultured in collagen gel. *Biomaterials* 17(14):1393-7.
- Thoumine O, Ott A. 1997. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* 110 (Pt 17):2109-16.
- Thoumine O, Ott A, Cardoso O, Meister JJ. 1999. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods* 39(1-2):47-62.

Propulsion par polymérisation d'actine

I.Introduction

I.1 Pathogènes et organites : de *Listeria monocytogenes* aux endosomes.

De curiosité microbiologique, la motilité de la bactérie *Listeria monocytogenes* s'est vite imposée comme le modèle de choix pour l'étude de la motilité cellulaire liée à la polymérisation d'actine. D'autres agents pathogènes se sont vus attribuer le même mécanisme de motilité, renforçant ainsi l'importance du phénomène. Ces dernières années enfin, nombre d'études ont montré que la propulsion par polymérisation d'actine n'était pas cantonnée à des pathogènes modèles mais existe en tant que véritable processus physiologique dans le transport de certains organites cellulaires.

Une recherche bibliographique non ciblée sur *Listeria monocytogenes* a le mérite de montrer l'importance de cette bactérie gram-positive dans l'industrie agro-alimentaire et la santé publique tant le nombre de publications est important dans ces domaines. En effet, cet agent infectieux, abondant dans les foins et les luzernes, peut se retrouver dans toute la chaîne alimentaire issue de l'élevage que ce soit dans les fromages au lait cru comme l'Epoisse ou dans des préparations charcutières douteuses qui l'ont fait connaître du grand public. Le cycle d'infection découvert par Tilney et Portnoy est décrit en figure I.1. Une fois ingérée, la bactérie se lie aux cellules hôtes grâce à une protéine exprimée à sa surface appelée internaline (Cossart and Lecuit 1998). Une fois internalisée, elle lyse le phagosome l'entourant puis prolifère. Elle développe ensuite un nuage d'actine autour d'elle qui se polarise et donne naissance à une structure en comète qui la propulse dans la cellule. La force produite par cette comète est suffisante pour déformer significativement la membrane de la cellule hôte et permet à la bactérie d'infecter une cellule adjacente après phagocytose et lyse. Si elle a échappé au système immunitaire avant la première internalisation, ce processus original de dissémination lui permet d'échapper ensuite aux défenses de l'organisme. C'est pourquoi, si cette bactérie est peu dangereuse pour les porteurs sains qui l'éliminent avant

internalisation, elle peut s'avérer parfois mortelle chez les immunodéprimés comme les femmes enceintes, les personnes âgées ou les séropositifs.

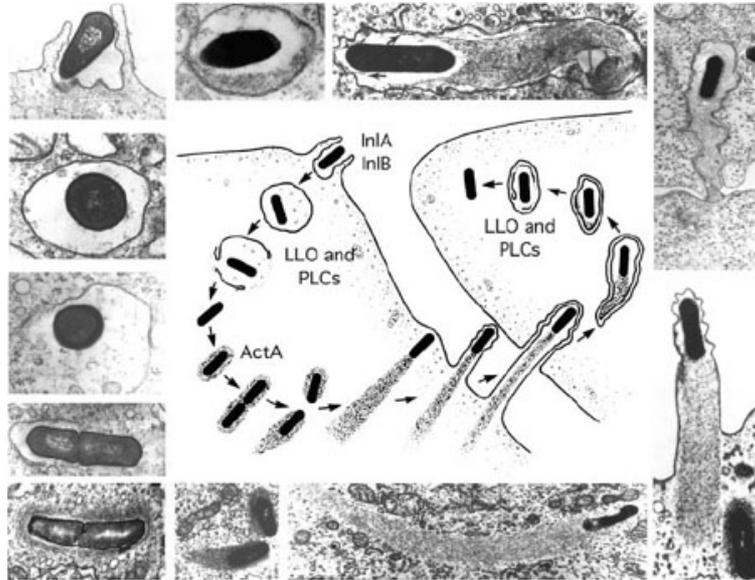


Figure I.1 Cycle d'infection de *Listeria monocytogenes*. Les images entourant le schéma sont des coupes de microscopie électronique représentant les différentes étapes. D'après (Portnoy, Auerbuch et al. 2002)

La raison principale pour laquelle cette bactérie s'est imposée comme modèle d'étude est qu'elle détourne la machinerie biochimique cellulaire de la motilité pour se mouvoir elle-même. Elle produit un gel d'actine par polymérisation à sa surface dont l'orientation est similaire à celui développé dans les lamellipodes (Tilney, DeRosier et al. 1992) et dont la vitesse de polymérisation est proche de la vitesse de la bactérie (Theriot, Mitchison et al. 1992). Pour ce faire, elle exprime à sa surface une protéine appelée ActA, nécessaire et suffisante à la motilité (Kocks, Marchand et al. 1995). Cette protéine se lie au complexe Arp2/3 responsable de la polymérisation locale de l'actine dans les cellules eucaryotes (Welch, Iwamatsu et al. 1997) de la même manière que le fait N-WASp, un des activateurs de ce complexe dans les cellules eucaryotes (voir figure I.2). On comprend ainsi l'avantage de ce modèle : on peut s'affranchir de toute la signalisation en amont de la cascade biochimique pour en déterminer les étapes et les acteurs. La manipulation des bactéries est par ailleurs plus aisée pour effectuer des études génétiques. Au fur et à mesure de l'intérêt croissant pour ce modèle sont apparus d'autres agents pathogènes qui exhibaient un mouvement similaire et dont il a été découvert qu'ils pirataient eux aussi cette machinerie de l'actine en se liant au complexe Arp2/3 ou en se liant à des activateurs en amont. Il en est ainsi de la bactérie

Shigella responsable de dysenteries. Elle exprime à sa surface la protéine IcsA qui a priori mime l'activation de N-WASp par cdc42 (Frischknecht and Way 2001). Il existe aussi un virus utilisant cette machinerie : la vaccine, de la famille du virus de la variole. Il présente à sa surface une protéine nommée A36R qui mime la signalisation provenant du récepteur tyrosine kinase. Ces agents viraux ou infectieux se déplacent ainsi de manière similaire à *Listeria* en développant une traînée d'actine qui les propulse (voir les images de la figure I.3) en détournant aussi la machinerie d'actine responsable de la protrusion des lamellipodes. Mais ce type de mouvement par propulsion n'est pas cantonné à des organismes exogènes aux cellules eucaryotes. Il a en effet été montré que des vésicules endocytaires appelées pinosomes ont un mouvement identique (Merrifield, Moss et al. 1999). De même, des endosomes et des lysosomes développent eux aussi des comètes d'actine similaires à celles de *Listeria* (Taunton, Rowning et al. 2000) comme cela est illustré en figure I.3. Les endosomes activent aussi le complexe Arp 2/3 grâce à un « recrutement » de N-WASp à leur membrane (Taunton 2001). On voit donc que ce type de mouvement existe physiologiquement dans la cellule.

La propulsion par polymérisation d'actine est ainsi utilisée par des entités qui sont, du point de vue évolutif, très éloignées. Elles n'ont pas hérité de cette faculté d'un ancêtre commun et il s'agit donc d'un phénomène de convergence (comme les chauves souris partagent avec les oiseaux la même morphologie d'ailes pour voler). On peut en déduire que cette manière de se déplacer dans les cellules est très efficace comme tout caractère convergent. Nous discuterons de cette efficacité ultérieurement lors des considérations physiques dans ce manuscrit.

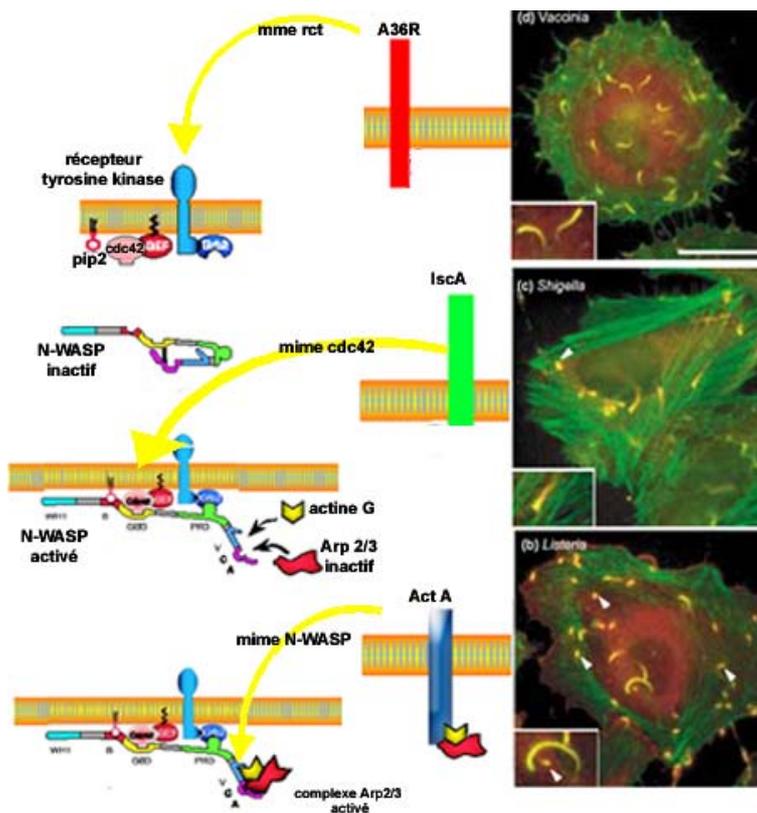


Figure I.2 Piratage de la machinerie d'actine (a) dans des cellules. (b) : *Listeria*, (c) : *Shigella* et (d) : virus de la vaccine (l'actine est marquée en vert et la cortactine en rouge. La couleur jaune rend compte d'une colocalisation entre ces deux protéines). Barre de calibration : 20µm. (D'après (Pantaloni, Le Clainche et al. 2001) et (Frischknecht and Way 2001)

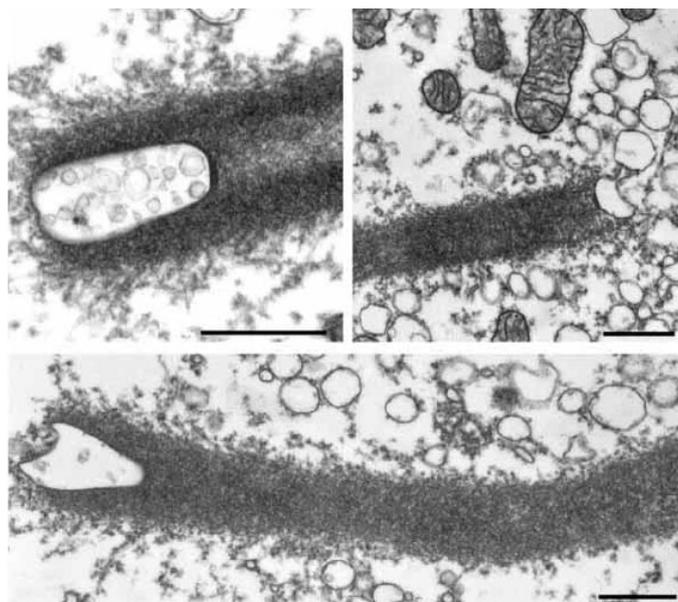


Figure I.3 coupes de microscopie électronique d'endosomes associés à des comètes d'actine. Barre de calibration 500nm. D'après (Taunton, Rowning et al. 2000).

I.2 La biochimie du mouvement

I.2.1 Les activateurs du complexe Arp 2/3 ou protéines activatrices

Il existe différents activateurs du complexe Arp 2/3, qu'ils soient endogènes ou exogènes. La protéine ActA de *Listeria* est un exemple d'activateur exogène. Elle possède un domaine de liaison à ce complexe dans sa partie N-terminale de même qu'un domaine de liaison à l'actine. Les protéines de la famille WASp/Scar sont des activateurs endogènes. Elles possèdent un domaine C-terminal commun nommé VCA qui se lie et active le complexe Arp2/3. La protéine N-WASp (pour Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein) en fait partie. Elle est exprimée dans tous les tissus et impliquée dans de nombreux processus où le complexe Arp2/3 joue un rôle. La suppression de cette protéine chez la souris mène à la mort de l'embryon de souris à un stade précoce. Elle est par ailleurs la cible de *Shigella* par exemple. Lorsqu'elle n'est pas activée, elle se trouve repliée en solution. Suite à un signal externe à la cellule, différents facteurs membranaires (comme la GTPase Cdc42 et le lipide PIP_2) sont activés et se lient à N-WASp. Ils relient ainsi cette protéine à la membrane et provoquent son ouverture. Une fois ouverte, la N-WASp peut se lier au complexe Arp2/3 en solution et l'activer (Pantaloni, Le Clainche et al. 2001).

I.2.2 Le complexe Arp2/3

Ce complexe de sept protéines largement conservé chez les eucaryotes a été identifié comme l'acteur central de la polymérisation d'actine à la membrane ou sur des agents pathogènes. Il est responsable de la structure branchée du gel créé à la surface. La manière précise dont le complexe branche les filaments d'actine est encore discutée. Toujours est-il qu'une fois activé à la surface, il se lie à un monomère d'actine et à un filament préexistant, dont le bout barbé pointe vers la surface, pour nucléer un filament fils qui va à son tour polymériser. Ce filament a une orientation préférentielle de 70° avec le filament père. L'action de ce complexe va ainsi permettre de multiplier les filaments d'actine qui polymérisent à la surface et d'engendrer par là le réseau branché d'actine observé tant chez *Listeria* que dans les lamellipodes comme l'illustre la figure I.4. Deux modèles ont été proposés pour le mécanisme de branchement d'Arp2/3 : la nucléation dendritique (Pollard and Borisy 2003) et le branchement autocatalytique au bout barbé (Pantaloni, Boujemaa et al. 2000). Le modèle de nucléation dendritique (figure I.5B) propose que le complexe Arp2/3 est activé par WAVE-Scar (2) puis

les deux se détachent de la membrane, diffusent puis viennent se lier à un filament d'actine (3) à une localisation proche de son extrémité barbée. Un protofilament d'actine est éventuellement nucléé après l'activation ou bien un nouveau filament est ensuite nucléé à partir du complexe fixé (4). Le modèle de branchement autocatalytique (figure I.5A) stipule lui qu'il se forme un complexe quaternaire entre la protéine de la famille WAVE-Scar, l'Arp2/3, un trimère d'actine G et enfin l'actine F (2). Un nouveau filament est nucléé après détachement de l'activateur d'Arp2/3 puis les filaments fils et père polymérisent (5). Ce modèle a été précisé par une étude récente qui montre que c'est suite à l'hydrolyse d'un ATP de l'actine-G liée à l'Arp2/3 que le complexe se sépare de l'activateur (3) (Le Clainche, Pantaloni et al. 2003). La validité des modèles est toujours discutée mais le fait que la protéine de type WAVE-Scar se détache semble en désaccord avec l'utilisation de systèmes biomimétiques dans lesquelles ces protéines sont fixées sur des billes et peuvent nucléer de l'actine des heures durant. Si c'était le cas, WAVE-Scar serait remplacée par n'importe quelle protéine s'adsorbant sur la bille en lieu et place de celle-ci et le mouvement s'arrêterait alors ou du moins ralentirait ce qui n'est pas observé.

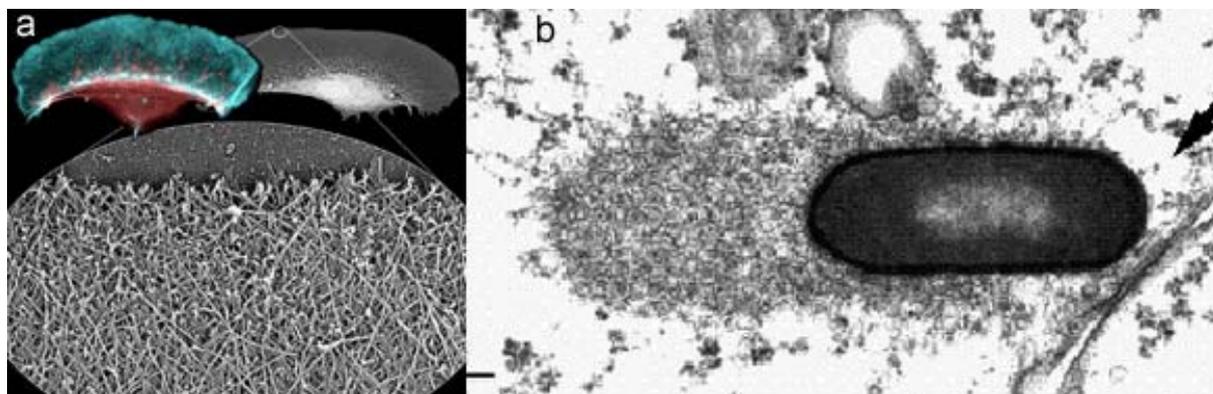


Figure I.4 microscopie électronique de réseau d'actine. a :lamellipode de keratocyte. b : *Listeria*

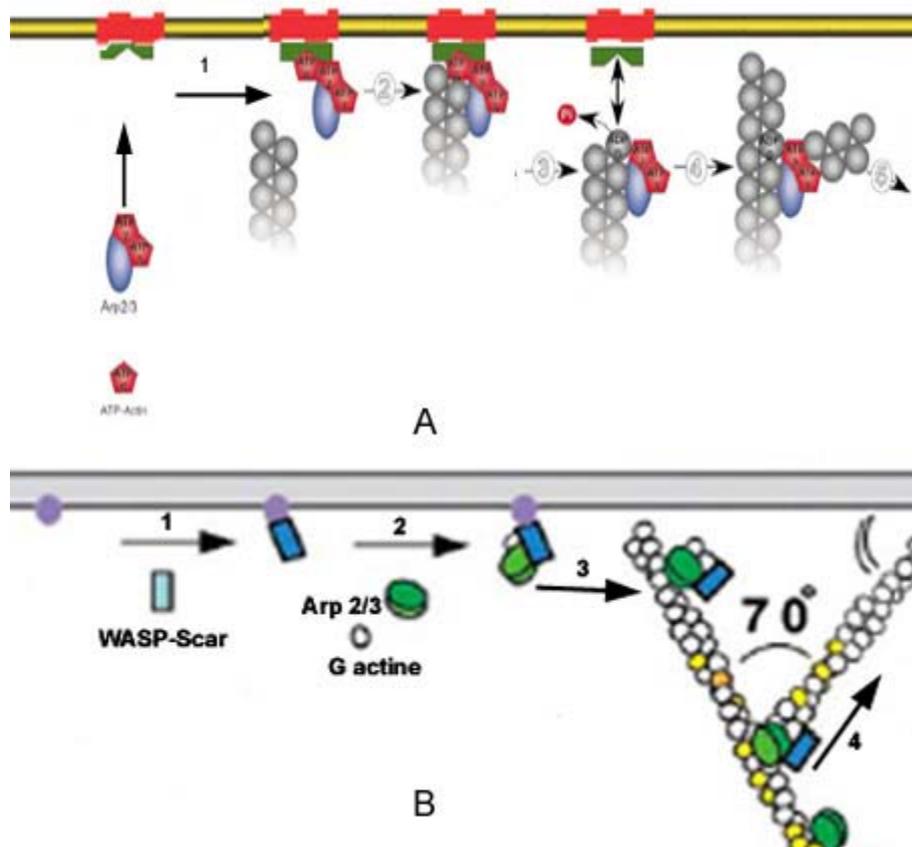


Figure I.5 : Mécanisme de branchement d'Arp2/3. A : modèle autocatalytique au bout barbé. B : Modèle de nucléation dendritique (d'après LeClainche 2003 et Pollard 2003)

I.2.3 Le système minimal

La combinaison du complexe Arp2/3 et de son activateur à la membrane expliquent la polymérisation dirigée d'actine sous forme de réseau branché. Toutefois, les cinétiques de « treadmilling » de l'actine sont telles que l'ajout de ces trois composants ne suffit pas à justifier la vitesse de polymérisation observée. En effet, dans le régime stationnaire, le treadmilling (polymérisation au bout barbé et dépolymérisation au bout pointu) s'effectue à une vitesse de l'ordre de $0,04\mu\text{m}/\text{min}$ pour des concentrations d'actine physiologiques (Pollard 2003). Or, les vitesses mesurées peuvent aller jusqu'à $10\mu\text{m}/\text{min}$ pour *Listeria* ou des lamellipodes de keratocytes. Il existe donc des facteurs qui accélèrent cette vitesse de treadmilling. L'ensemble des facteurs nécessaires et suffisants à ce processus, outre l'actine, l'Arp2/3 et son activateur, a été identifié par l'équipe de Marie-France Carlier (Loisel, Boujemaa et al. 1999). Ce sont la capping protein (ou la gelsoline), l'ADF (actin depolymerizing factor), et la profiline.

- **La gelsoline** est une protéine coiffante de l'actine. Elle se fixe au bout barbé des filaments et empêche l'ajout de nouveaux monomères. Un tel filament ne peut donc que se raccourcir en régime stationnaire par dépolymérisation au bout pointu. Par conséquent, des monomères d'actine G libres (ADP) sont générés et deviennent disponibles. L'équilibre de polymérisation aux bouts barbés non coiffés est ainsi déplacé (loi de Lechâtelier). Le treadmilling est donc augmenté par l'ajout de gelsoline (figure I.6.C). Le fait d'arrêter la polymérisation au bout barbé a aussi un effet sur la structure du gel puisque la concentration en gelsoline régule la longueur moyenne des filaments. Cet effet sera discuté par la suite.
- **L'ADF** (pour Actin Depolymerizing Factor) se lie à l'actine (G ou F) sous forme ADP préférentiellement. Cette protéine polymérise autour des filaments avec une hélicité différente de l'actine. Les filaments sont alors déstabilisés à cette extrémité et dépolymérisent. Par conséquent, comme l'actine ADP se trouve du côté pointu, l'ADF a pour effet d'augmenter la dépolymérisation à cette extrémité et de générer par-là des monomères d'actine libre (voir figure I.6B). Le treadmilling est ainsi augmenté de manière similaire à l'effet de la gelsoline.
- **La profiline** se lie préférentiellement aux monomères d'actine sous forme ATP pour former un complexe qui a la propriété de ne s'associer qu'au bout barbé des filaments (figure I.6 D) L'ajout de profiline accélère la dissociation du complexe ADF-actineG(ADP) pour former le complexe profiline-actineG(ATP) La vitesse du treadmilling est alors augmentée par ce double effet de déplacement et de liaison préférentielle au bout barbé.

La synergie de ces molécules permet d'engendrer la motilité par polymérisation d'actine. Le mécanisme moléculaire complet est résumé en figure I.7 dans le cas du modèle autocatalytique.

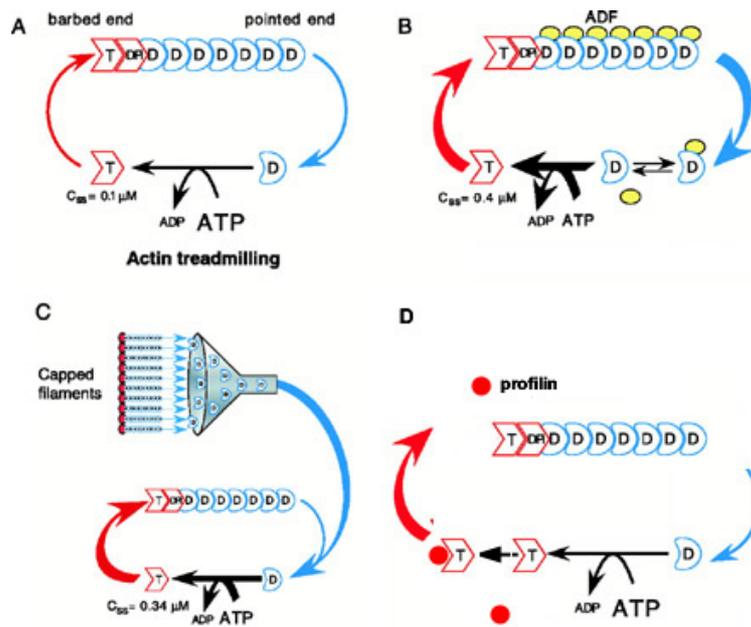


Figure I.6. Accélération du treadmilling de l'actine(A) par l'action de l'ADF(B), de la gelsoline(C) et de la profiline(D)

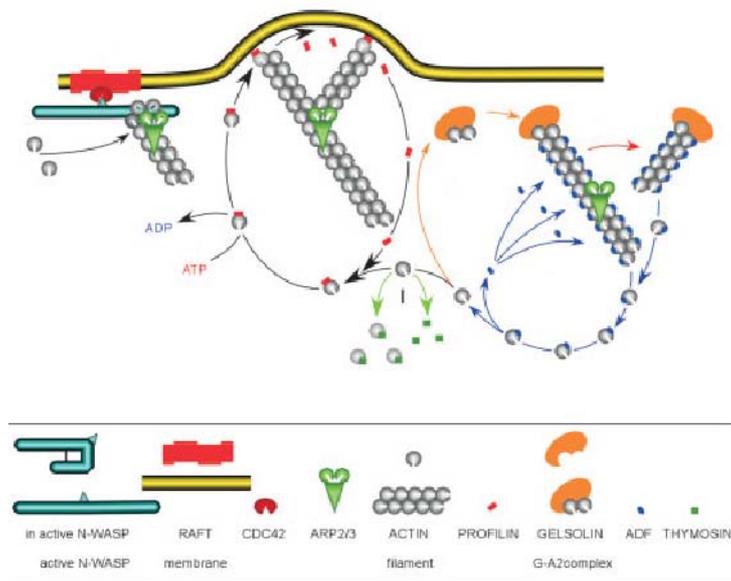


Figure I.7. Mécanisme complet. D'après(Carlier, Wiesner et al. 2003)

On a pu voir que l'action des protéines du milieu minimal avait pour effet, pour certaines d'entre elles, d'augmenter le treadmilling et par conséquent d'accélérer la polymérisation au bout barbé, en interaction avec l'obstacle à déplacer. Mais il y a un autre paramètre du système qui est régulé par ce milieu, c'est la structure du réseau d'actine. On a déjà vu que

c'est Arp 2/3 qui est responsable de la géométrie des branchements. Mais leur densité est dépendante non seulement de la concentration d'Arp2/3 et de son activateur, mais aussi des autres composants du milieu et en particulier de la gelsoline. En effet, la gelsoline coiffant un bout barbé, celui-ci peut plus se lier à l'Arp2/3 et donc le branchement ne peut plus avoir lieu. Elle va donc avoir un effet sur la densité de branchement. Par ailleurs, la vitesse de polymérisation étant régulée par les concentrations en Gelsoline, ADF et profiline, une variation de la concentration de ces protéines va modifier la longueur entre deux branches et donc modifier aussi la densité de branchement. Finalement on peut dégager trois paramètres pertinents qui sont variables en fonction de la concentration des protéines du milieu : la vitesse de treadmilling, la fréquence de branchement et la fréquence de capping.

I.3 Les systèmes biomimétiques

Suite à la découverte que la protéine ActA était suffisante pour engendrer la propulsion d'actine, comme cela a été montré en inoculant cette protéine dans des bactéries *Escherichia Coli* (Kocks, Marchand et al. 1995), plusieurs équipes ont tenté de mettre au point des systèmes biomimétiques sur des supports non biologiques. Le but était de greffer cette protéine sur des billes (latex ou polystyrène). L'avantage est de pouvoir contrôler non seulement la géométrie du support de la polymérisation d'actine mais aussi d'en contrôler les paramètres de surface comme la densité de activateur, ce qu'il est impossible de faire sur la bactérie. Les premières mises au point de systèmes biomimétiques ont été effectuées sur des billes de polystyrène (Cameron, Footer et al. 1999; Noireaux, Golsteyn et al. 2000). La protéine ActA a été adsorbée ou greffée sur des billes de taille variable. Les billes plongées dans des extraits cellulaires de xénope ou d'Hela développent un gel d'actine symétrique au début. Seule le système de billes adsorbées de diamètre inférieur à 0,75 μ m ont produit une comète et donc un mouvement alors que les billes greffées ne produisaient pas de comète. La technique de greffage a plus tard été abandonnée. L'apparition du système minimal de protéine a ajouté un degré de contrôle en plus puisque toutes les entités qui participent à la polymérisation d'actine sont contrôlées (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002), (Wiesner, Helfer et al. 2003). On distingue aujourd'hui deux types de systèmes biomimétique sur support rigide :

- Billes de polystyrène recouvertes de activateur (symétrique ou asymétrique) dans des extraits cellulaires
- Billes de polystyrène recouvertes de activateur dans le système minimal de protéines.

Des systèmes à support flexible (ou « billes molles ») ont aussi été développés à partir de vésicules lipidiques (Upadhyaya, Chabot et al. 2003), (Giardini, Fletcher et al. 2003) ou d'émulsion d'huile (Boukellal 2003). Tous ces systèmes sont mis au point avec des extraits cellulaires pour l'instant. L' activateur ActA a été utilisé dans les deux études sur vésicule et a été fixé par greffage entre un résidu histidine se trouvant sur la protéine et un groupement NiNTA chélatant fixé à un des types de lipides composant la membrane. Le système d'émulsion emploie la partie VCA de WASP qui est simplement adsorbée à l'interface huile-solution aqueuse. Une fois plongés dans des extraits ces systèmes développent des comètes et se déplacent dans la solution.

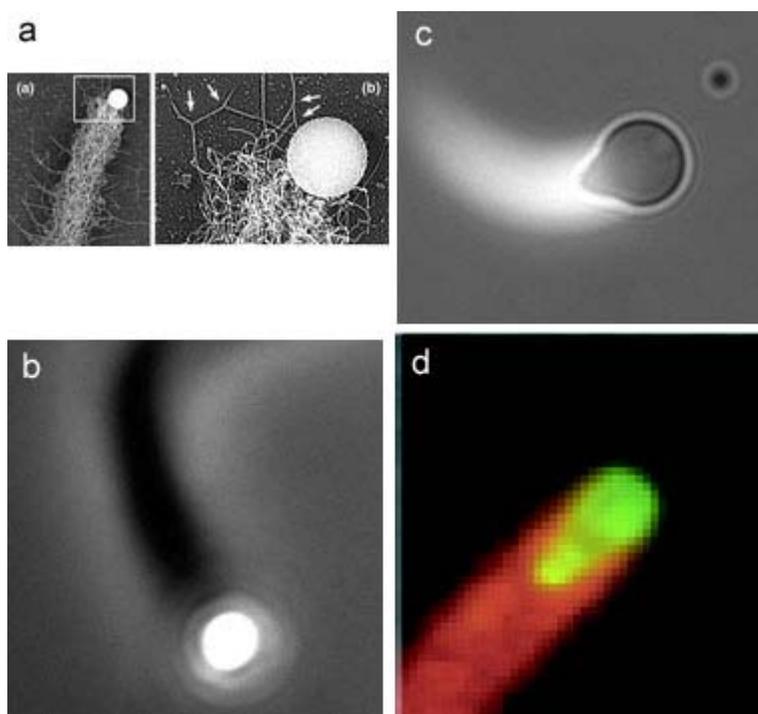


Figure I.8: Différents systèmes biomimétiques a. microscopie électronique de billes adsorbées avec ActA dans des extraits cellulaires. b. bille recouverte de N-WASp dans le milieu de motilité reconstitué. c. image en transmission combinée à de la fluorescence (actine) d'émulsions d'huile recouvertes de VCA dans des extraits Hela. d. vésicules greffées VCA dans des extraits de cerveau.

I.4 Mesures physiques

I.4.1 Elasticité du gel

Gerbal et coll. ont montré que le gel développé par *Listeria monocytogenes* est élastique (Gerbal, Laurent et al. 2000). En découpant des morceaux de comètes à l'aide d'un laser puis en y collant des billes, ils ont exercé une force à l'aide de pinces optiques. Lorsque les comètes sont droites, deux billes maintiennent les extrémités de la portion tandis qu'une troisième bille est déplacée perpendiculairement à l'axe. Dans le cas des comètes courbes, deux billes suffisent et celles-ci sont rapprochées. Le module d'Young du gel a pu être ainsi mesuré. Il se situe entre 10^3 et 10^4 Pa.

I.4.2 Brisure de symétrie

Pour générer une comète et donc le mouvement, les systèmes initialement isotropes doivent briser leur symétrie. C'est un des phénomènes qui a le plus attiré les théoriciens de la matière molle férus de ce type de comportement dans les transitions de phase. Après avoir développé une couronne d'actine à symétrie sphérique, une dissymétrie apparaît (voir figure I.9) puis le gel forme une comète. Le gel d'actine est alors distribué avec une symétrie axiale. Les échelles de temps sur lesquelles s'opère ce phénomène sont variables suivant le système utilisé et la géométrie. Pour des billes en extraits cellulaires, la brisure s'opère après une heure environ (Cameron, Footer et al. 1999). Des billes placées dans le système minimal reconstitué peuvent former des comètes après quelques minutes (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002). Les deux systèmes diffèrent par la nature de l'activateur ainsi que par la composition du milieu. Ces différences peuvent donc venir d'un grand nombre de facteurs. Mais certaines expériences (figure I.10) permettent de préciser l'influence cruciale de deux paramètres quel que soit le système: la densité du gel et la courbure du support. En effet la variation de la densité de l'activateur (ActA pour a ou N-WASP pour b) modifie la probabilité de briser la symétrie. Par ailleurs une augmentation de la gelsoline entraîne une augmentation de la densité de branchement du gel en parallèle avec une diminution de la proportion de billes brisant la symétrie (Wiesner, Helfer et al. 2003). On sait que les extraits cellulaires contiennent beaucoup de protéines réticulant l'actine ce qui augmente le module d'Young du gel. Cela peut être une piste pour expliquer les différences observées entre les deux systèmes. Le deuxième paramètre important est la courbure du support. Une augmentation du diamètre

des billes s'accompagne d'une diminution de la fraction de bille portant une comète dans le système d'extraits. Dans le milieu de motilité, on observe en parallèle avec l'augmentation du diamètre une augmentation du temps de brisure de symétrie. La courbure joue donc elle aussi un rôle prépondérant. L'influence de ces deux paramètres sera discutée dans la partie modélisation théorique.

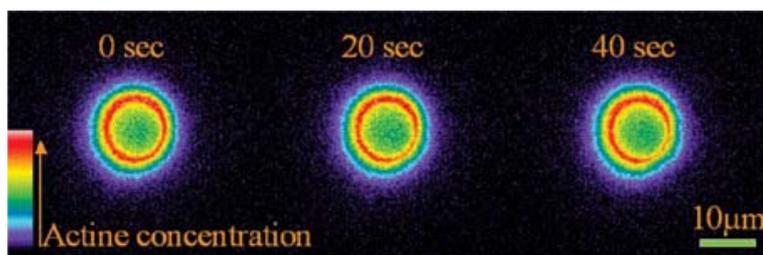


Figure I.9 brisure de symétrie d'une bille recouverte d'ActA placée dans des extraits.

Les systèmes à bille molle montrent eux aussi une brisure de symétrie mais beaucoup plus rapide. En raison de la fluidité de la membrane (ou de l'interface) les activateurs sont mobiles et viennent s'accumuler à l'arrière de la bille molle. Les temps de brisure de symétrie sont beaucoup trop rapides pour que le processus de brisure ait pu être observé dans le temps. Une fois la symétrie brisée, les molécules d'ActA sont localisées en coïncidence avec le gel d'actine ce qui laisse supposer une interaction entre ces dernière et le réseau (Giardini, Fletcher et al. 2003; Upadhyaya, Chabot et al. 2003). Par ailleurs, ce phénomène n'est pas dépendant de la déformation des vésicules puisque des billes recouvertes de lipides, présentant elles aussi une mobilité des nucléateurs mais sans déformabilité, subissent elles aussi cette ségrégation de protéines (Giardini, Fletcher et al. 2003)).

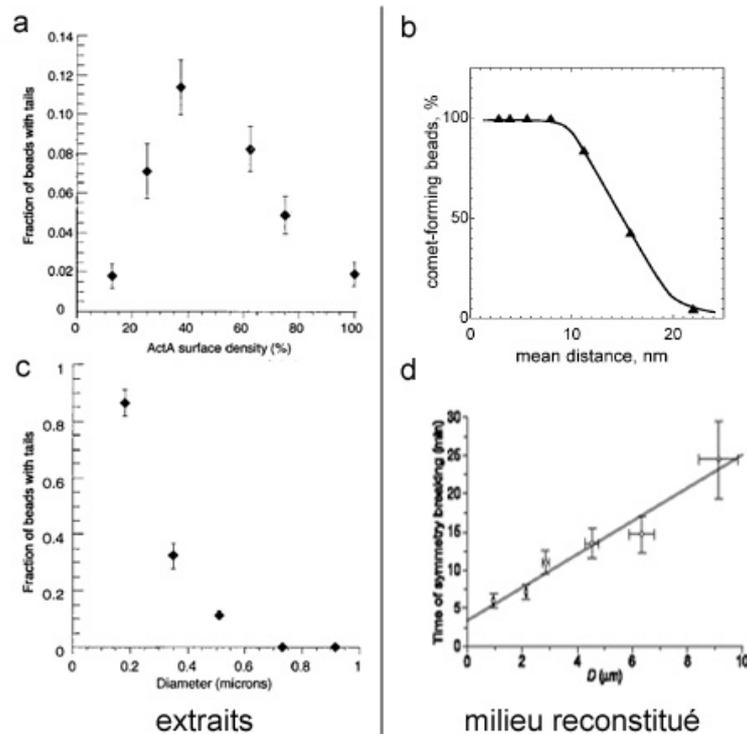


Figure I.10 Influence de la densité de nucléateur et de la courbure du support sur la brisure de symétrie. Fraction de billes formant des comètes en fonction de la densité de nucléateur (a,b) et du diamètre des billes (c) d : Temps de brisure de symétrie en fonction du diamètre. (D'après Cameron 1999, Wiesner 2003 et Bernheim-Grosswasser 2003)

I.4.3 Variation des vitesses en fonction des paramètres

Une fois la symétrie brisée, les billes voient leur vitesse augmenter pour atteindre un régime stationnaire en une dizaine de minutes (Wiesner 2003). Les vitesses observées diffèrent suivant le système utilisé : elles sont plus rapides dans les extraits cellulaires (jusqu'à 10 µm/min) que dans le milieu reconstitué (de 0.5 à 5 µm/min) pour des raisons qui ne sont pas encore claires. Un bon candidat est la présence de la protéine VASP dans les extraits. Elle est connue pour augmenter la vitesse des *Listeria* en solution (Smith, Theriot et al. 1996). Récemment un travail a montré que l'ajout de cette protéine au milieu de motilité reconstitué augmente la vitesse des billes d'un facteur 3 (Samarin, Romero et al. 2003).

- Dépendance géométrique

La vitesse des billes en fonction du diamètre a été étudiée dans les deux systèmes. Dans les extraits, les expériences ont montré que les petites billes (0,2 µm) bougent plus lentement que les grosses (1 µm) (Cameron, Footer et al. 1999). Dans le milieu reconstitué, par contre, la

vitesse est inversement proportionnelle au rayon pour des diamètres allant de 1 à 3 μ m (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002). Ce résultat a ensuite été contesté par une étude dans ce même milieu qui en a conclu qu'il n'y avait pas de variation en fonction du rayon (Wiesner, Helfer et al. 2003). Le problème est que ces trois études ont été effectuées avec trois activateurs différents à des concentrations assez éloignées. La conclusion est ainsi difficile.

- Influence de la structure du gel

L'influence de ce paramètre a été étudiée de manière exhaustive dans le cas du milieu reconstitué (Figure I.11, Wiesner 2003). Lorsqu'on augmente la densité de N-WASp sur les billes, la quantité d'actine présente dans la comète augmente elle aussi (b). Si on s'intéresse maintenant aux vitesses, on voit que la vitesse atteint un plateau pour une distance moyenne entre molécule de 2.8-5.6 nm (a). Le fait que la vitesse n'augmente plus lorsque la densité de N-WASp est accrue est interprété par l'existence d'une force interne qui s'oppose au mouvement. Le même type d'expérience a été réalisé dans des extraits cellulaires (Cameron 1999). Les auteurs n'observent pas de variation en fonction de la densité d'ActA. Mais la plus petite valeur qu'ils ont testée est 25% de la concentration saturante en ActA. Le plateau observé par Wiesner et coll. se situe à une proportion inférieure ou égale (entre 10 et 28%) Il se peut qu'ils se trouvent déjà dans le plateau et ne peuvent donc pas mesurer la variation initiale. Wiesner et coll. ont par ailleurs fait varier la concentration de la protéine coiffante dans le milieu reconstitué. Ils ont tout d'abord pu déterminer une quantité qui rend compte de l'espacement moyen entre branchements (c). Cette quantité diminue avec la gelsoline ce qui montre que son augmentation accroît la densité du gel. La vitesse augmente aux faibles concentrations puis diminue avec la gelsoline pour les concentrations supérieures (d). La gelsoline régule donc négativement la vitesse à une fréquence de branchement donnée (c'est-à-dire à concentration en N-Wasp et Arp2/3 constantes).

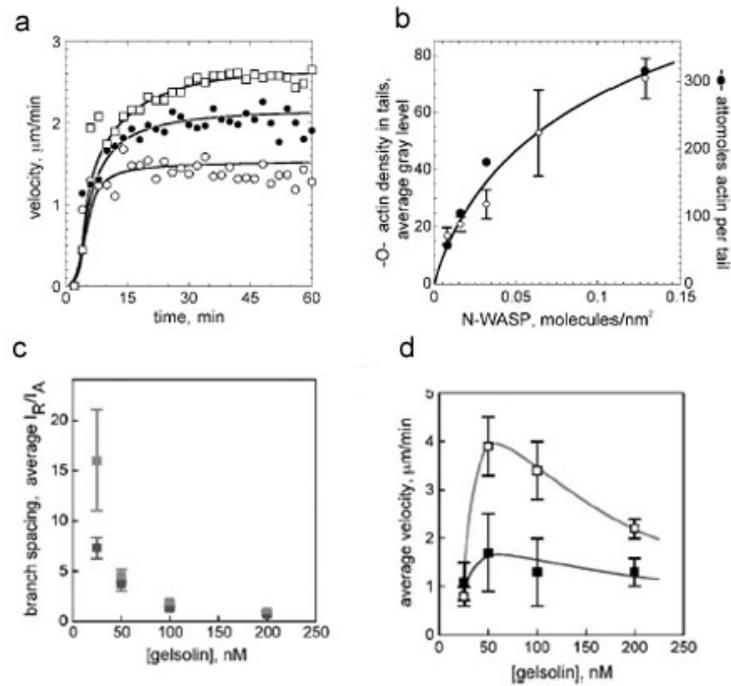


Figure I.11 Influence de la structure du gel a,b variation de N-WASP c,d : variations de la gelsoline (d'après Wiesner 2003)

I.4.4 Forces locales mesurées sur des vésicules

Les systèmes de vésicules (ou d'émulsions) ont permis les premiers une estimation directe des forces locales exercées par le gel sur le support (Giardini, Fletcher et al. 2003; Upadhyaya, Chabot et al. 2003). La membrane de la vésicule étant flexible, elle peut se déformer sous l'action de la contrainte exercée par le gel. Lorsqu'elles avancent, elles adoptent une forme en poire qui rend compte de la répartition locale des forces. La forme est déterminée en appliquant l'équation de Laplace à la vésicule. A l'avant de la vésicule (ou de la goutte), la vésicule de forme hémisphérique est libre c'est-à-dire qu'elle ne subit pas de contrainte locale puisqu'il n'y a pas de gel d'actine. L'équation de Laplace s'écrit simplement $\Delta P = \gamma C_0$ où γ est la tension de surface et C , la courbure. En présence du gel, dans la partie arrière, la contrainte exercée par le gel vient s'ajouter à la différence de pression et la relation s'écrit alors : $\Delta P + \sigma_g = \gamma C_i$. Les auteurs supposent que la pression est homogène dans la vésicule et la tension est constante sur la surface. On peut ainsi déduire en tout point la contrainte exercée par le gel avec la relation $\sigma_g = \gamma(C_i - C_0)$. Finalement connaissant γ , il est possible de d'avoir une mesure de cette contrainte en mesurant la courbure de la membrane au point

considéré. La mesure de γ étant impossible dans ces études, seule une estimation est fournie. Les auteurs déduisent de cette analyse que la vésicule subit des forces compressives sur les flancs de la comète qui participent à la propulsion et des forces rétractiles à l'arrière qui s'y opposent (voir figure I.12). Ces forces expliquent la forme de poire qui caractérise ces vésicules. Giardini et coll. estiment par intégration des contraintes que la force exercée pour maintenir cette forme est entre 0,4 et 4nN mais seulement 10% de cette force participe au mouvement puisque la majeure partie de la force est perpendiculaire à la direction de ce mouvement. Upadhyaya et coll. donnent eux une valeur maximale des contraintes de compression et de rétraction qui sont respectivement de 3-4nN/ μm^2 et 6-8nN/ μm^2 .

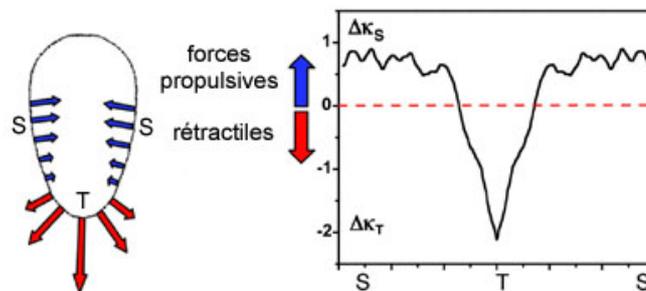


Figure I.12. Répartition des forces dans les vésicules. Le graphique représente la différence de courbure entre l'avant et le point considéré en fonction de son abscisse curviligne. (d'après Upadhyaya 2003)

I.4.5 Mouvements saltatoires

Deux types de mouvements saltatoires à deux échelles différentes ont été mis en évidence dans les systèmes à propulsion par polymérisation d'actine. Ils ont une origine physique différente. Un premier type a lieu à l'échelle nanométrique chez *Listeria*. McGrath et coll. ont détecté par suivi laser des pas de 5,4nm dans le mouvement de la bactérie (Kuo and McGrath 2000). Cette périodicité correspond à la taille d'un monomère d'actine. Les auteurs proposent que le mouvement soit limité par quelques filaments qui sont sous tension le long desquels s'exerce un glissement avec une périodicité de 5,4nm. Comme le font justement remarquer Upadhyaya et coll., il est surprenant qu'une telle périodicité du mouvement soit observable étant donné que des centaines de filaments participent au mouvement (Upadhyaya and van Oudenaarden 2003). Le deuxième type de mouvement saltatoire a une périodicité spatiale plus grande, de l'ordre de la taille du support de polymérisation. Il a été observé dans

trois systèmes différents : la *Listeria*, les billes dans le milieu reconstitué et enfin avec les vésicules. Bien que provenant de systèmes différents, ces mouvements saltatoires présentent une grande similitude. La première observation a été faite chez un mutant de *Listeria* par Lasa et coll. (Lasa, Gouin et al. 1997) représenté en figure I.13. Chaque période du mouvement se décompose en deux phases. Une phase lente qui coïncide avec une forte densité d'actine et une phase rapide accompagnée d'une densité plus faible. Ce type de mouvement a été reproduit avec des billes dans le milieu reconstitué (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002). En modifiant la taille des billes utilisées, ces auteurs ont montré que l'on pouvait passer d'un mouvement continu pour des tailles inférieures à $2\mu\text{m}$ à un mouvement saltatoire au-dessus de $3\mu\text{m}$ qui devient périodique au-dessus d'un diamètre de $4\mu\text{m}$. Ainsi la seule variation d'un paramètre géométrique peut donner lieu à ce type de mouvement. On observe le même type de transition en modifiant la densité de nucléateur à la surface (Bernheim-Groswasser, Prost et al. 2003). Le mouvement est lui aussi composé d'une succession de deux phases pour lesquelles une forte vitesse coïncide avec une faible densité du gel (figure I.13). Enfin, le système de vésicules dans des extraits cellulaires est le dernier exemple en date de ce type de mouvement (Upadhyaya 2003). La vitesse est périodique elle aussi mais une nouvelle indication est apportée par la nature du système. En effet, le maximum de vitesse coïncide avec le moment où le rapport d'aspect inverse sa tendance c'est-à-dire qu'il passe d'une forme allongée à une forme sphérique. Ceci montre que la phase rapide provient d'une rupture de la connexion gel-support suivie d'une relaxation de la contrainte exercée par le gel ce qui produit le mouvement rapide. Cette hypothèse avait déjà été avancée (Gerbal, Chaikin et al. 2000) et fera l'objet de plus de détails dans la partie modélisation.

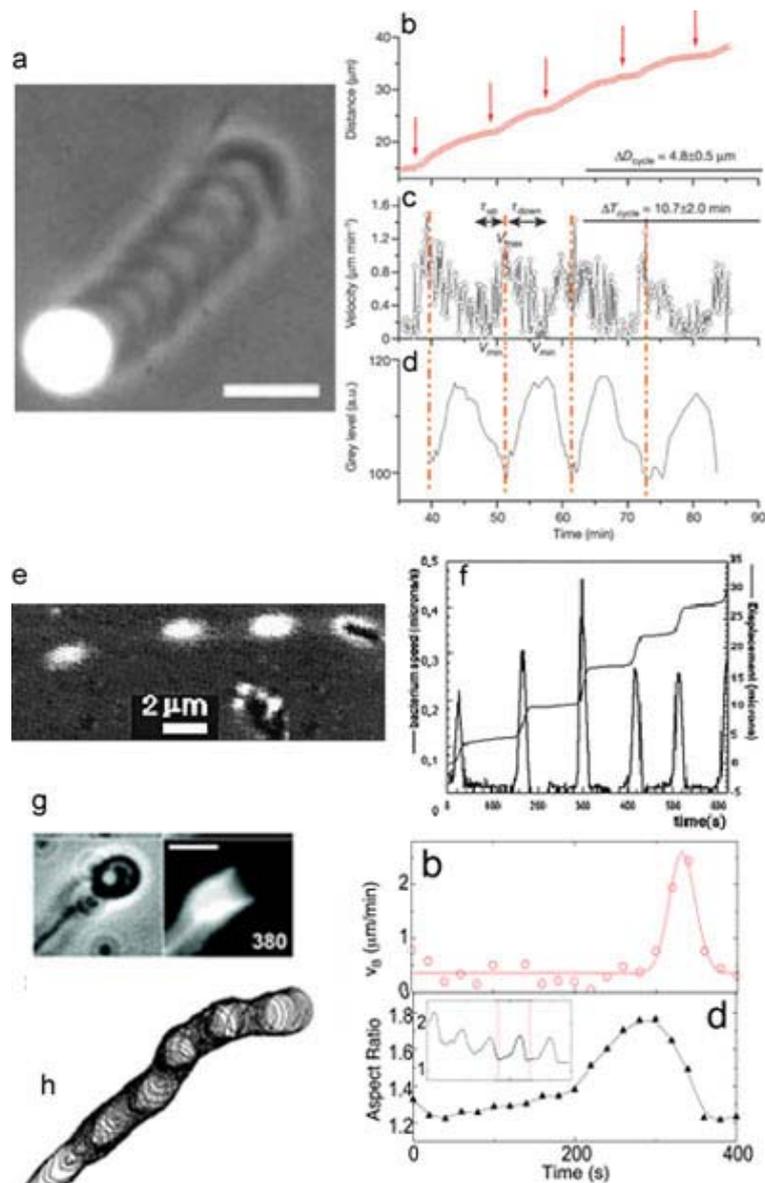


Figure I.13. mouvements saltatoires. a-d) billes dans le milieu reconstitué. e-f) Mutant de *Listeria*. g-i) vésicules. (d'après Bernheim-Grosswasser 2003, Gerbal 2000a, Upadhyaya 2003)

I.4.6. Interaction support/comète

La première démonstration de l'existence d'une force qui lie la comète à son substrat a été réalisée sur *Listeria* par Gerbal et coll. (Gerbal 2000a). Ils ont montré qu'il n'est pas possible de séparer la bactérie de la comète avec une pince optique. La force liant la comète à la bactérie est donc supérieure à 10pN qui est la force du piège. Une mesure du coefficient de diffusion de *Listeria* par microrhéologie par suivi laser (LTM) (kuo 2000) va dans le même sens. Ces fluctuations sont 20 fois moins élevées que celle d'objets libres de taille similaire

dans le même milieu ce qui indique que la bactérie est attachée à la comète. A partir de l'analyse des fluctuations, une rigidité équivalente de 40pN/nm a été déduite à partir du théorème d'équipartition de l'énergie. Enfin, la forme des vésicules développant une comète permet-elle aussi de déduire l'existence d'une connexion entre l'actine et la surface. En effet, les vésicules s'allongent sous l'effet d'une force rétractile qui ne peut agir que si cette connexion existe sans quoi la vésicule relaxerait (Giardini 2003, Upadhyaya 2003). Il arrive que cette interaction soit si forte que la connexion se rompe. Upadhyaya et coll. ont pu déduire une estimation de l'interaction actine-vésicule en mesurant la contrainte rétractile maximale avant rupture dans les mouvements saltatoires déjà mentionnés : 5-10nN/ μm^2 ce qui équivaut à une force de rupture de 10 à 20pN par filament d'actine (Upadhyaya 2003). On peut remarquer que cette force par filament est bien inférieure à la force que peuvent supporter les filaments d'actine sous tension (Liu and Pollack 2002). Il s'agit donc d'une rupture qui intervient à un autre niveau. Il ne peut pas s'agir de la liaison entre ActA et la surface puisque après rupture le gel peut se reformer. C'est vraisemblablement le lien entre ActA et le complexe Arp2/3-actine qui est rompu.

I.4.7 Relations Force vitesse

La relation force vitesse est une caractéristique essentielle de tout moteur. Si l'on s'intéresse à une voiture, on définit la puissance d'un moteur à partir du maximum de la courbe qui décrit le couple fourni par l'arbre moteur en fonction de sa vitesse de rotation (le régime moteur). Une telle courbe est illustrée par la figure I.14 pour l'Aston Martin DB7. Le but de ce moteur est de produire le couple qui va servir à faire tourner les roues. Dans le cas qui nous intéresse, qui est un mouvement de translation, c'est la vitesse que la bille peut produire en fonction de la charge qui lui est appliquée qui est la relation pertinente. Elle nous renseigne sur la capacité qu'a la propulsion par polymérisation d'actine à soutenir son mouvement lorsqu'elle rencontre un obstacle. Du point de vue évolutif, cette capacité est une pression de sélection puisqu'elle est essentielle pour la dissémination de la bactérie *Listeria monocytogenes*. En effet, ce pathogène doit traverser les parois cellulaires pour venir infecter d'autres cellules. Elle rencontre alors des forces qui s'opposent à son mouvement qui peuvent aller jusqu'à quelques nanonewton. Si elle n'est pas capable de maintenir son mouvement pour traverser cette paroi, elle ne pourra pas se disséminer et donc se reproduire, ce qui est le but de toute bactérie

(Monod). Aussi la pression de sélection a été assez forte pour qu'elle se dote d'un mécanisme de locomotion qui lui confère un mouvement robuste.

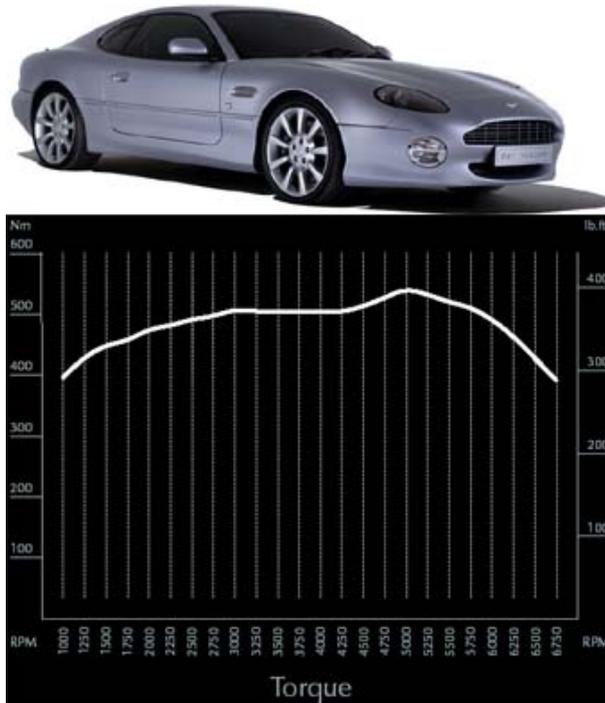


Figure. I.14 Courbe du couple en fonction du régime moteur du moteur de l'Aston Martin DB7

On verra par ailleurs, dans la partie modélisation, que cette fonction est la prédiction de choix des différents modèle pour être confrontés aux expériences. Jusqu'ici, deux études expérimentales ont été réalisées dans ce but : avec des *Listeria* se déplaçant dans des extraits de cerveau (McGrath, Eungdamrong et al. 2003) et avec des billes dans le milieu reconstitué (Wiesner 2003). Pour modifier la force externe appliquée au système, ces deux travaux ont joué sur la viscosité en ajoutant au milieu un polymère : la méthylcellulose. Mais la mesure de viscosité diffère puisque McGrath et coll. ont mesuré une viscosité locale par LTM (Laser Tracking Microrheology) directement à côté des bactéries et Wiesner et coll. ont mesuré une viscosité nominale (la viscosité moyenne de la solution) par différentes techniques rhéologiques (LTM, cellule de couette, viscosimètre bas cisaillement). Les courbes obtenues diffèrent fortement (figure I.15) McGrath et coll. trouvent un comportement bi phasique composé d'une très forte décroissance (facteur 20) de 0 à 50pN suivie d'une très faible décroissance jusqu'à 180pN. Au contraire, Wiesner et coll. ont eux observé une décroissance plus faible de 0 à 50pN avec une diminution maximale de 30%. Il y a différentes hypothèses susceptibles d'expliquer l'incompatibilité entre ces études. Tout d'abord, les viscosités

mesurées par les deux études sont totalement différentes. McGrath et coll. mesurent des viscosités locales allant jusqu'à 10^4 Pa.s alors que la viscosité nominale de leur solution n'excède pas la dizaine de Pa.s. Il est assez étonnant que de telles variations puissent survenir dans la solution. Les auteurs expliquent ce fait par la présence de micro hétérogénéités et par des « effets de mur » provenant des parois des chambres d'observation. Si une bactérie rencontre un mur, elle va être stoppée et la comète poussera en sens inverse (Wiesner 2003). Ainsi si une mesure de vitesse est effectuée, la force, elle, sera inconnue. Par ailleurs, la méthylcellulose a non seulement pour effet de viscosifier le milieu mais elle a aussi un effet sur l'assemblage de l'actine. En effet, un phénomène de déplétion intervient dont une explication simplifiée est la suivante. Supposons que l'on ait une population de particules (dans notre cas des filaments d'actine) à laquelle on ajoute des polymères (méthylcellulose) de rayon de giration R_g petit devant la taille des particules et qui n'interagissent pas avec celles-ci. Si deux particules se rapprochent l'une de l'autre à une distance inférieure à R_g , les polymères qui se trouvent coincés perdent leur forme de pelote statistique. Cette situation est entropiquement défavorable puisque les polymères ont tendance à « s'ordonner » entre les particules. Ces polymères sont donc chassés de l'espace interparticule ce qui diminue la concentration à cet endroit. Par conséquent cette diminution locale de concentration induit une pression osmotique qui va s'exercer sur les deux particules et accentuer le rapprochement. La présence de polymère induit donc une interaction attractive entre les particules dont l'énergie s'écrit $W = -\rho R_g kT$ où ρ est la densité (Israelachvili 1985). La méthylcellulose produit cet effet sur les filaments d'actine comme le montre l'augmentation de diffusion de la lumière au cours de la polymérisation d'actine (Wiesner 2003). Wiesner et coll. ont noté que l'ajout d'une méthylcellulose courte dont l'effet sur la viscosité nominale est insignifiant, augmente la densité des comètes et diminue la vitesse des billes. Pour tenir compte de cet effet, Wiesner et coll. ont normalisé leurs vitesses par la vitesse de billes dans un milieu auquel on a ajouté la même concentration massique de cette méthylcellulose courte. McGrath et coll. n'ont pas tenu compte de ce phénomène. Enfin, il est possible que cette différence ne vienne que du système biochimique utilisé. Un candidat potentiel pour la discrimination des études pourrait être la molécule VASP présente dans les extraits mais absente du milieu de motilité reconstitué. Cette protéine est connue pour augmenter la vitesse des bactéries d'un facteur 10 (Smith, Theriot et al. 1996) et pourrait produire un alignement des filaments d'actine (Plastino) dans le sens du mouvement, ce qui rendrait plus sensible la polymérisation à une force externe.

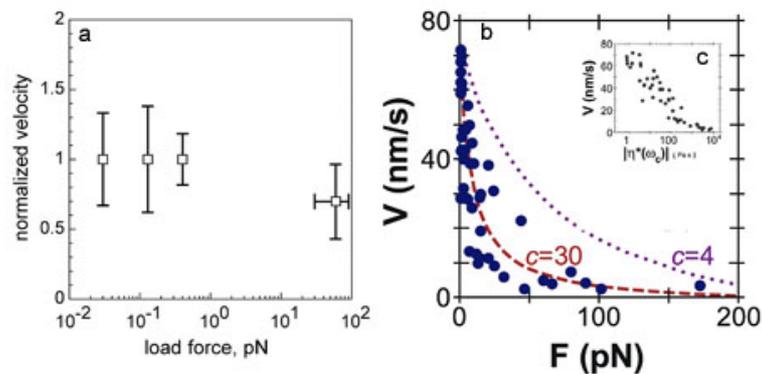


Figure I.15 : Relations force vitesse mesurées par variation de la viscosité. a: Wiesner et coll. b: McGrath et coll. c: vitesse en fonction de la viscosité (McGrath, Eungdamrong et al. 2003)

I.5 Modélisation Théorique

Il existe à l'heure actuelle quatre travaux théoriques pour expliquer la propulsion par polymérisation d'actine, trois modèles microscopiques (Carlsson 2001; Dickinson and Purich 2002; Carlsson 2003; Mogilner and Oster 2003) et une analyse élastique mésoscopique (Gerbal, Chaikin et al. 2000; Prost 2001).

I.5.1 Le cliquet thermique et ses raffinements : élastique et attaché (Mogilner and Oster 2003)

Le premier modèle élaboré a été le « cliquet thermique » inspiré des travaux de Hill et Kirshner sur l'effet des forces sur la polymérisation (Hill and Kirschner 1982; Upadhyaya and van Oudenaarden 2003). Il supposait que les fluctuations de la bactérie (ou de la bille) permettaient l'insertion d'un monomère ce qui biaisait la diffusion (« Brownian ratchet » (Peskin, Odell et al. 1993)). Cette version a ensuite été modifiée pour tenir compte des fluctuations élastiques des filaments proches de la surface (« Elastic Ratchet » (Mogilner and Oster 1996)). Enfin, suite aux preuves expérimentales montrant qu'il existe une force liant le gel au support, la prise en compte de l'attachement des filaments a donné naissance au « Elastic Ratchet and Tethered Filament ». Je ne décrirai que ce dernier qui a remplacé les précédents.

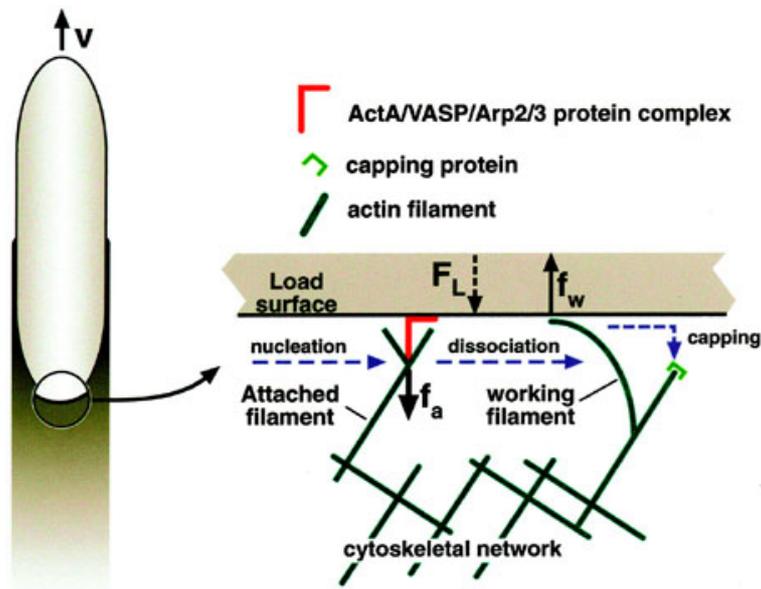


Figure I.16 : Le modèle du cliquet élastique et attaché. D'après (Mogilner 2003)

Le modèle stipule qu'il y a deux classes de filaments : les filaments attachés à la surface par le complexe ActA/Arp2/3 ou WASP/Arp2/3 (au nombre de a), et les filaments « travaillant » qui polymérisent avant d'être coiffés (au nombre de w). Ces deux populations suivent la dynamique suivante :

Filaments attachés a :

$$\frac{da}{dt} = n - \delta \cdot a \quad (1)$$

où n et δ sont respectivement les taux de nucléation, et détachement

Filaments « travaillant » w :

$$\frac{dw}{dt} = \delta \cdot a - \kappa w \quad (2)$$

où κ est le taux de coiffage.

L'existence du terme n indique qu'il s'agit d'un modèle de type « nucléation dendritique »

Dans le régime stationnaire, ces équations s'écrivent simplement : $a = \frac{\delta}{n}$ et $w = \frac{\delta}{\kappa} a$ Les

filaments de chaque population i exercent une force f_i qui est supposée être la même pour tous. L'équilibre des forces s'écrit donc :

$$F_{ext} = f_w \cdot w - f_a \cdot a \quad (3)$$

Il faut ensuite écrire la dépendance de la vitesse en fonction de la force :

$$V = V_{\max} \exp\left(-\frac{f_w l}{kT}\right) - V_{\text{dép}} \quad (4)$$

où V_{\max} est la vitesse de polymérisation libre et $V_{\text{dép}}$ la vitesse de dépolymérisation et l la longueur ajoutée à la projection du filament sur la direction du mouvement. Pour calculer le taux de dissociation, les auteurs utilisent une relation déterminée par Evans (Evans and Ritchie 1999) :

$$\delta = \delta_0 \exp(fx_b / kT) \quad (5)$$

où x_b est la largeur du puits de potentiel qui décrit le lien moléculaire et f représente la force exercée sur un lien de raideur k pendant t . Le gel est assimilé à un réseau de ressorts en série et k représente le ressort le plus faible. La valeur moyenne de cette force est aussi égale à la force f_a . Finalement en régime stationnaire, les auteurs aboutissent à l'équation réduite suivante :

$$v = v^0 \exp(-\varepsilon_1 v \omega^2(v) - \varepsilon_2) - v_d \quad (6)$$

avec $v=V/V_0$, $v^0=V_{\max}/V_0$, $\varepsilon_1 = \frac{l\kappa}{x_b \delta_0}$ et $\varepsilon_2 = \frac{F_{\text{ext}} l \kappa}{kT n}$ est le travail effectué sur le support par

filament travaillant et enfin $\omega(v)$ est une fonction qui décrit la dépendance du taux de détachement (≈ 1 quand $v \ll 1$ et $\approx -\ln(v)/v$ quand $v \gg 1$)

Les résultats obtenus avec ce type de modèle sont :

- **Calcul de la vitesse des billes dans les extraits** : Mogilner et Oster obtiennent une valeur de la vitesse des billes qu'ils comparent à celles observées par Cameron et coll. (Cameron, Svitkina et al. 2001). Ce type de prédiction est un peu artificiel puisque pour aboutir à ce résultat, les auteurs doivent estimer en tout 5 paramètres et utiliser les valeurs de 4 autres à partir de données dans la littérature. Ces données diffèrent beaucoup suivant les conditions expérimentales. Par ailleurs, ils affirment que la quantité x_b est tabulée alors qu'ils ne savent pas exactement quel est le lien moléculaire qui casse. Les prédictions numériques de ce type sont donc à considérer avec beaucoup de précaution.
- **La densité de coating et la concentration en extrait n'affecte pas la vitesse des billes**: cette prédiction vient du fait que dans le cas des billes, la force externe est quasi nulle et donc le terme $\varepsilon_2 = \frac{F_{\text{ext}} l \kappa}{kT n}$ disparaît si n n'est pas trop faible. Le taux de nucléation n , qui en première approximation doit être proportionnel à la densité de coating et à la concentration d'Arp2/3 ne joue donc pas. En ce qui concerne la densité de coating, les

études expérimentales confirment qu'au-dessus d'une certaine densité, la vitesse est indépendante de la densité (Cameron, Footer et al. 1999) De même, la concentration en extrait a peu d'influence sur la vitesse dans des extraits (Cameron, Svitkina et al. 2001) et ne devrait pas trop en avoir dans le milieu reconstitué puisqu'il est montré que c'est le rapport entre Arp2/3 et la Gelsoline qui compte. Les prédictions du modèle sont donc ici vérifiées.

- **Les petites billes bougent moins vite** : aucun paramètre ne tient compte de la géométrie du support dans ce modèle. Pourtant leurs auteurs tentent de justifier les observations de Cameron et coll. en arguant que plus la bille est petite, plus les filaments qui poussent avec un angle ont une chance de rater la bille. Ces considérations ne peuvent s'appliquer que pour des billes extrêmement petites et dans des conditions de très faible nombre de filaments et ne sont donc pas très pertinentes. D'ailleurs, d'autres expériences réfutent le fait que des petites billes bougent moins vite (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002; Wiesner, Helfer et al. 2003))
- **La relation force-vitesse est biphasique et dépend de la densité de la comète** : La relation force vitesse prédite (figure I.17) présente une forte décroissance aux faibles forces et une décroissance beaucoup plus faible à partir de 30pN. Elle décrit très bien la courbe mesurée par McGrath et coll. mais ne parvient pas à expliquer celle observée par Wiesner et coll. Par ailleurs, il est aisé de voir qu'étant donné que le terme qui tient compte de la force et du taux de nucléation est proportionnel au rapport F_{ext}/n , ces deux paramètres sont couplés et donc doivent varier de concert à vitesse égale. C'est-à-dire que, considérant une vitesse donnée, si on multiplie n par trois, la force qui doit donner la même vitesse doit être trois fois supérieure et donc la courbe est moins décroissante. Par ailleurs, si on augmente la force, le taux de nucléation augmente lui aussi et par conséquent la densité s'accroît. Cette dernière prédiction sur la densité reste à vérifier puisque les mesures de densité effectuées sont affectées par la méthylcellulose.
- **Modèle stochastique** : à partir du modèle analytique, les auteurs écrivent un modèle stochastique. Ils justifient la stochasticité du phénomène par un petit nombre de filaments, de l'ordre de quelques dizaines. Si cette hypothèse peut s'appliquer dans le cas particulier des études de Cameron à faible densité de filaments, elle ne peut vraisemblablement pas s'appliquer aux autres études puisque c'est justement parce que la densité de filaments dans ces cas là est trop grande que Cameron et coll. ont choisi ces conditions :

“The high density of actin filaments in comet tails formed by pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* or *Shigella flexneri* has hindered their structural analysis. Consequently, we examined tails formed by latex beads coated with the *L. monocytogenes* surface protein, ActA, where we could control density of the tails by varying bead size and ActA concentration” extrait de (Cameron, Svitkina et al. 2001).

Enfin, le principal argument pour discuter ce modèle vient du fait que Mogilner et Oster considèrent les filaments en contact avec la surface de manière indépendante dans l'écriture de l'équilibre des forces. Cela revient à dire que le gel auquel ils sont connectés est rigide par rapport aux filaments. Le gel étant constitué des mêmes filaments, cet argument est discutable.

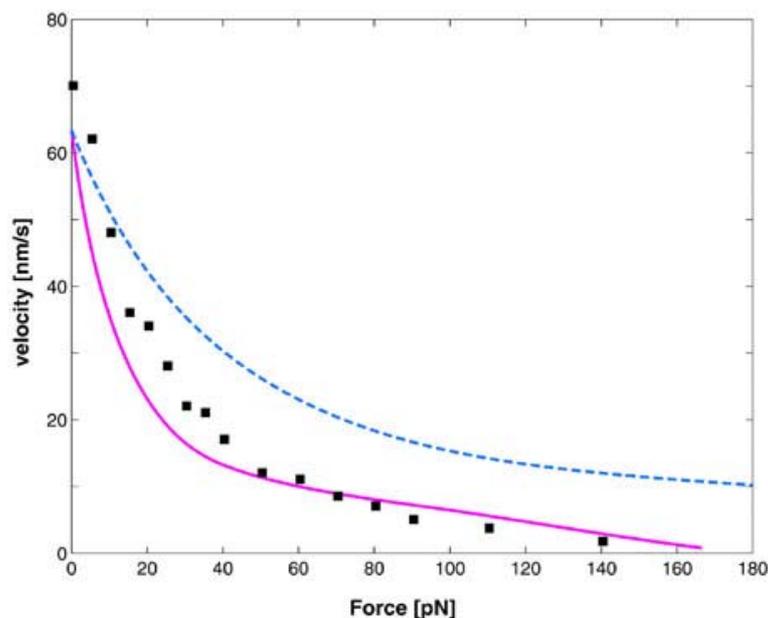


Figure I.17 relation force vitesse du modèle EBR (rose) Carrés : modèle stochastique. Tirets : augmentation d'un facteur 3 du taux de nucléation. D'après (Mogilner and Oster 2003)

I.5.2 Croissance de réseaux branchés (Carlsson 2001; Carlsson 2003)

Afin de prédire le comportement de réseaux branchés poussant contre un obstacle, Carlsson a effectué des simulations (Carlsson 2001) puis a écrit un modèle analytique correspondant (Carlsson 2003). Le principe des deux approches est de considérer un réseau d'actine qui pousse contre une charge matérialisée par un demi-plan. La croissance est décrite par des taux

de polymérisation, de branchement, de capping, de débranchement et de dépolymérisation (voir figure I.18).

I.5.2.a Simulations

Les simulations sont effectuées en générant les filaments avec les taux précédemment décrits. L'influence de l'obstacle est décrite par une énergie qui varie avec la distance filament-obstacle au cube. La probabilité d'ajouter un monomère est modulée par le facteur de Boltzman associé à cette énergie. Enfin, la vitesse est calculée en écrivant que la distance parcourue par l'obstacle par intervalle de temps est une équation de Langevin discrétisée. Le coefficient de diffusion de l'obstacle est choisi plus faible que celui des objets libres utilisés pour rendre compte de l'attachement du réseau à l'obstacle. La simulation est alors utilisée avec différentes hypothèses moléculaires suivant l'absence ou la présence des phénomènes suivants :

- Orientation des branchements
- Branchement seulement au bout barbé
- « uncapping » ou décoiffement

Ces simulations permettent de prédire pour les différents modèles les structures obtenues (voir un exemple figure I.18b) et la variation d'observables (vitesse, densité, espacement entre branches) suivant les taux de branchement ou de capping. Il est possible de discriminer entre des modèles qui ont de l'uncapping. Malgré l'optimisme de l'auteur, on ne peut pas discriminer entre les modèles qui ne comportent pas d'uncapping. Par contre, les simulations permettent de prédire une décroissance de la vitesse et de la densité en fonction du taux de capping. Par ailleurs la simulation prévoit que la vitesse ne varie pas en fonction de la force bien que la densité augmente avec celle-ci. Les travaux de Wiesner et coll. ont pu montrer la validité de la prédiction sur la diminution de la vitesse et de la densité de branchement avec le taux de coiffe ce qui permet d'éliminer l'hypothèse d'uncapping.

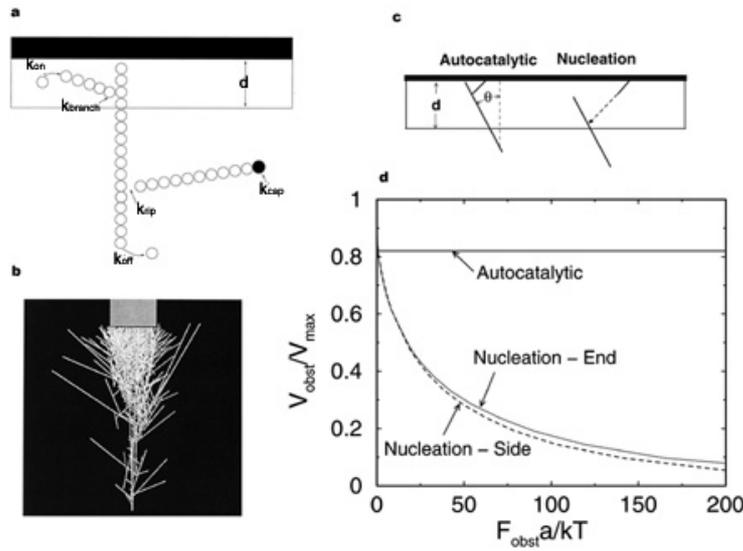


Figure I.18 : Croissance de réseaux branchés simulation (a-b) et modélisation (c-d) a: schéma de la simulation. b: réseau d'actine derrière un obstacle (cas de l'hypothèse autocatalytique à orientation préférentielle). c: schéma du modèle. d: diagramme force vitesse du modèle pour les deux hypothèses.

I.5.2.b Modélisation analytique (Carlsson 2003)

Carlsson a écrit un modèle qui prolonge et explique ses simulations où il prédit une discrimination possible entre les modèles de nucléation dendritique et ceux autocatalytique à partir de la relation force vitesse. Ce modèle confirme les prédictions des simulations quant à la variation de la vitesse en fonction du taux de branchement et du taux de capping. Il met par ailleurs en évidence la pertinence du rapport de ces deux taux par rapport aux taux isolés. L'hypothèse majeure est que la formation des nouveaux filaments ne peut s'effectuer que dans une région d'épaisseur donnée d . Ces filaments sont créés avec une orientation d'angle aléatoire. La différence majeure entre le modèle autocatalytique et le modèle dendritique est que l'équation qui régit la dynamique des filaments croissants est linéaire par rapport au nombre de filaments dans le premier cas et ne l'est pas dans le deuxième. D'autre part, la force exercée sur l'obstacle, qui compense la force externe, est elle aussi linéaire avec le nombre de filaments dans les deux cas. Il en résulte que, dans le cas du modèle autocatalytique, si un triplet (n, F, V) est solution de l'équation, un triplet $(\alpha n, \alpha F, V)$ l'est aussi. La force est donc indépendante de la vitesse dans ce cas. L'interprétation physique de cette propriété est que si la force augmente, la vitesse diminue de manière transitoire ce qui entraîne la création de nouveaux filaments (puisque les filaments existants passent plus de temps dans la zone de création d'épaisseur d). Le nombre de filaments devient alors suffisant

pour compenser la force et la vitesse retrouve sa valeur stationnaire. Cette propriété est entièrement inhérente au modèle et il suffit que l'une des réactions biochimiques mise en cause ne soit pas d'ordre 1 en nombre de filaments pour que cette propriété ne soit plus vérifiée ce qui fragilise le modèle. Dans le cas du modèle dendritique, la force est décroissante (voir figure I.18d) avec un comportement similaire au modèle EBR bien que la physique utilisée dans le modèle soit différente (Upadhyaya and van Oudenaarden 2003). Ce modèle ne tient compte ni de l'attachement des filaments à la surface ni de l'élasticité des filaments ou du gel.

I.5.3 L'analyse élastique (Gerbal, Chaikin et al. 2000; Prost 2001)

I.5.3.a Principe de l'analyse

L'analyse élastique est un traitement à l'échelle mésoscopique de la propulsion par polymérisation d'actine. Elle rend compte non pas de l'action de filaments individuels mais de la coopérativité de leur action. L'origine de ce traitement vient de la preuve expérimentale que le gel développé par la *Listeria* est élastique. C'est cette propriété qui sous-tend l'essentiel de l'analyse. Le principe est schématisé par la figure I.19. Une couche de gel croît, vient s'insérer à l'interface support/gel et déforme le gel préexistant induisant une contrainte tangentielle dans le gel maximale à la surface externe du gel et nulle sur la bille(2). L'intégration de cette contrainte résulte en une tension qui, en présence de courbure, induit une contrainte normale similaire à une pression de Laplace. L'intégrale de cette contrainte normale sur la surface de la bille est la force élastique de propulsion (2). Le gel a donc emmagasiné une énergie élastique qu'il faut relaxer. Ceci s'effectue par un glissement auquel est associée une friction du gel sur le support dont la résultante est une force interne qui s'oppose au mouvement (3). En régime stationnaire, ces deux forces internes s'équilibrent avec la force externe appliquée au système. Cet équilibre impose la vitesse de la bille (4).

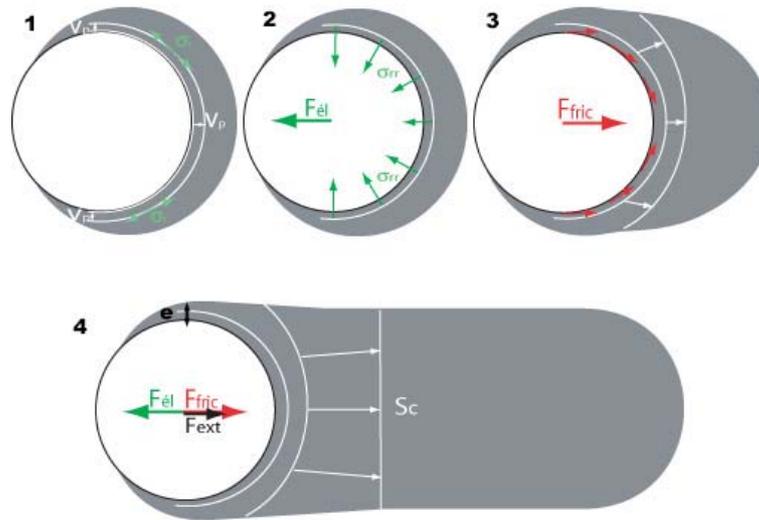


Figure I.19 la propulsion par polymérisation selon l'analyse élastique. 1-3 composantes internes. 4 régime stationnaire.

L'analyse de Gerbal et coll. est effectuée sur la bactérie dont la géométrie diffère des billes. Par ailleurs, ils ont traité la comète comme l'association de deux gels (externe et interne) J.Prost a repris cette étude en symétrie sphérique avec une analyse dimensionnelle. Les grandeurs sont obtenues à des constantes près mais les comportements déduits par Gerbal et coll. restent les mêmes. Dans un souci de simplicité, c'est cette approche qui est explicité ici.

I.5.3.b Force internes exercées sur la bille

Si on nomme e l'épaisseur du gel au-dessus de la bille, R le rayon de la bille et E le module élastique du gel la contrainte radiale sur la surface de la bille peut s'écrire, dans le cas où e/R est petit (Noireaux, Golsteyn et al. 2000):

$$\sigma_{rr} = 2E \left(\frac{e}{R} \right)^2 \quad (1)$$

L'énergie emmagasinée par unité de longueur est $We \cong 2E \left(\frac{e}{R} \right)^2 2\pi R^2 e$ et la force s'écrit

alors : $F_{el} \cong 4\pi E \frac{e^3}{R}$. Si l'on suppose la densité du gel constant, la conservation du flux s'écrit

$eV = RV_p$ où V_p est la vitesse de polymérisation du gel à la surface. C'est une grandeur moyenne locale différente de la vitesse de polymérisation des filaments. On peut alors écrire la force en fonction de la vitesse :

$$F_{el} \cong ES \left(\frac{V_p}{V} \right)^3 \text{ où } S \text{ est la surface de la bille.} \quad (2)$$

L'interaction entre le gel et la surface est décrite par la dynamique de la connexion des filaments au complexe activateur-nucléateur (WASP-Arp2/3). Ils sont liés pendant un temps τ_c et déconnectés pendant un temps τ_d . Lorsqu'ils sont connectés, le glissement du gel vers l'arrière entraîne la déflexion des filaments ce qui crée une force par filament. La force résultante est le produit de cette force locale par le nombre moyen de filaments connectés qui est $n_c = n \frac{\tau_c}{\tau_c + \tau_d}$. La force locale est simplement le produit de la déflexion par le module élastique d'un filament c'est-à-dire $f_{filament} = K.V\tau_c$. La rigidité est calculée en fonction du module élastique du gel $K \cong \frac{E}{\lambda}$ où λ est la distance moyenne entre réticulations. Finalement, la force résultante peut s'écrire :

$$F_{interaction} \cong S \frac{En\tau_c^2}{\lambda(\tau_c + \tau_d)} V \cong S\xi_i V \quad (3)$$

Il s'agit d'une force proportionnelle à la vitesse et donc d'une force de friction. A cette force s'ajoute la friction classique entre les deux matériaux que sont le gel et la bille caractérisée par un coefficient de friction ξ_s . La force totale qui caractérise l'interaction entre le gel et la surface est donc une force de friction qui s'écrit :

$$F_f \cong S(\xi_i + \xi_s)V = S\xi V$$

La vitesse est déterminée par l'équilibre entre la force élastique, la force de friction et la force externe appliquée à la bille. En l'absence de force extérieure ou lorsque celle-ci est négligeable comme c'est le cas pour la force de friction visqueuse dans les extraits, la vitesse devient :

$$V = V_i^{1/4} V_p^{3/4} \text{ avec } V_i = \frac{E}{\xi} = \frac{\lambda(\tau_c + \tau_d)}{\tau_c^2} \quad (4)$$

Dans le cas d'une force extérieure, l'équilibre s'écrit : $F_{ext} + F_{el} + F_f = 0$ et la relation entre force et vitesse devient alors :

$$-F_{ext} = ES \left(\frac{V_p}{V} \right)^3 - S\xi V \quad (5)$$

II.5.3.c Influence de la contrainte sur la polymérisation.

La vitesse de polymérisation du gel à la surface interne est gouvernée par l'équation différentielle : $\frac{dV_{int}}{dt} = k_+^b c_i - k_-^b$ où k_+^b est le taux de polymérisation au bout barbé et c_i est la concentration locale en monomères. Le taux de polymérisation dépend des contraintes appliquées au gel. A la surface interne du gel, c'est la contrainte normale qui module la polymérisation. Le taux de polymérisation s'écrit alors :

$$k_+^b = k_+^{b0} \exp\left(-\frac{e^2}{e_+^2}\right) \text{ avec } e_{+/-} = R \left(\frac{kT}{a_+ l^2 E} \right)^{1/2} \quad (6)$$

Si on se place en régime stationnaire et si l'on néglige la dépolymérisation, la vitesse de polymérisation à la surface interne peut s'écrire : $V_p = V_p^0 \exp\left(-\frac{e^2}{e_+^2}\right)$. En réécrivant la condition de conservation du flux on obtient :

$$V_p \approx V_p^0 \exp\left(-\frac{R^2}{e_+^2} \left(\frac{V_p}{V} \right)^2\right) \quad (7)$$

I.5.3.d Mouvements saltatoires

Dans un régime de grande vitesse, les connexions cassent vite si bien que le temps moyen où le filament est lié τ_c est très inférieur à la valeur thermodynamique de τ_c^0 . Le travail effectué pendant ce temps par le filament est égal à la barrière d'énergie de la dissociation w_b . On a

donc $Kv\tau_c a \cong w_b$. La force d'interaction s'écrit maintenant $F_f \cong \frac{nw_b^2}{\tau_c Kv}$

Cette force tend vers zéro à grande vitesse car les liens sont rompus. Si l'on résume maintenant le comportement de la force de friction et qu'on l'exprime par filament, on trouve :

$$f_f = f_i + \frac{\xi_s}{C_s} v \quad \text{avec} \quad f_i = \begin{cases} \frac{\xi_i}{C_s} v & v \ll 1 \\ \frac{a}{v} & v \gg 1 \end{cases} \quad \text{où } C_s \text{ est la concentration en activateur}$$

Le régime des faible vitesse est donc caractérisé par une force de friction classique avec un coefficient microscopique de friction $\xi = \xi_i + \xi_s$ grand. Le régime des grandes vitesses est lui aussi une friction classique mais avec un coefficient de friction plus faible ξ_s . Entre les deux, la dépendance en $1/v$ engendre une branche qui décroît avec la vitesse et qui est donc instable. Ce comportement est résumé par la courbe représentée sur la figure I.20 (en noir). Pour les billes libres, le point de fonctionnement est défini par l'intersection entre la force motrice (en $1/v^3$) et la force de friction. Les billes de faible diamètre (1-3 μm) recouvertes de VCA dans l'étude de Bernheim-Grosswasser et coll. (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002) travaillent dans le régime de faible friction qui correspond à la branche de droite sur la figure I.20. Cela implique que dans la majeure partie du temps, les filaments sont déconnectés du gel et seule la friction de glissement classique du gel sur la bille compense la force propulsive. Lorsque le diamètre augmente, le point de fonctionnement descend jusqu'à atteindre la zone instable (puisque $F_{el} \sim e^3/D$). Une fois dans ce domaine (pour des billes de 4.5 à 10 μm), un régime oscillatoire apparaît et la vitesse oscille entre deux valeurs V_{min} et V_{max} comme cela est montré sur la figure I.13c. Lorsque la vitesse est minimale, le coefficient de friction est grand (les filaments sont le plus souvent attachés). Du gel s'accumule et la vitesse augmente donc avec la force élastique. Lorsque la force élastique a atteint la force de friction seuil F_{th} , une rupture catastrophique des filaments intervient. La force de friction ne compense plus la force élastique et la bille est propulsée jusqu'à atteindre une vitesse maximale V_{max} sur la branche de la friction faible. La bille retrouve ensuite la vitesse V_{min} lorsque qu'une nouvelle couche de gel liée à l'acivateur est formée (trajet en pointillés sur la figure I.20). Un nouveau cycle recommence alors. Bernheim-Grosswasser et coll. ont aussi montré qu'une augmentation de la densité de gel pouvait mener à passer du régime continu au régime oscillatoire (Bernheim-Groswasser, Prost et al. 2003).

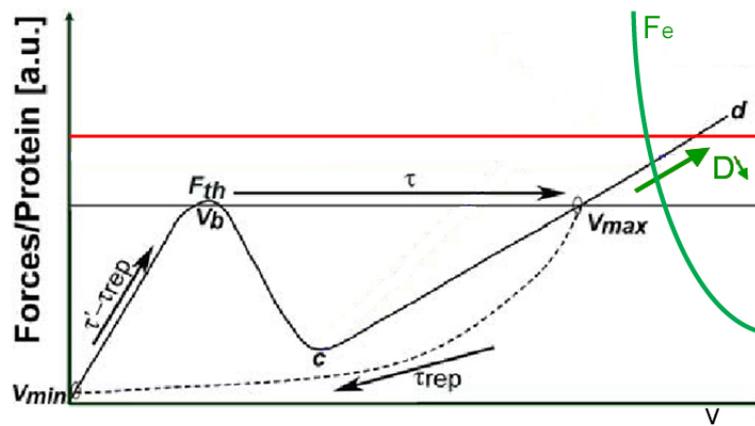


Figure I.20 : Instabilité dynamique : courbe de la force de friction par molécule (d'après (Bernheim-Groswasser, Prost et al. 2003))

- Bernheim-Groswasser, A., J. Prost, et al. (2003). "Mechanism of actin based motility: a dynamic state diagram." in preparation.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, et al. (2002). "The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters." Nature **417**(6886): 308-11.
- Cameron, L. A., M. J. Footer, et al. (1999). "Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4908-13.
- Cameron, L. A., T. M. Svitkina, et al. (2001). "Dendritic organization of actin comet tails." Curr Biol **11**(2): 130-5.
- Carrier, M. F., S. Wiesner, et al. (2003). "Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro." C R Biol **326**(2): 161-70.
- Carlsson, A. E. (2001). "Growth of branched actin networks against obstacles." Biophys J **81**(4): 1907-23.
- Carlsson, A. E. (2003). "Growth velocities of branched actin networks." Biophys J **84**(5): 2907-18.
- Cossart, P. and M. Lecuit (1998). "Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling." Embo J **17**(14): 3797-806.
- Dickinson, R. B. and D. L. Purich (2002). "Clamped-filament elongation model for actin-based motors." Biophys J **82**(2): 605-17.
- Evans, E. and K. Ritchie (1999). "Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains." Biophys J **76**(5): 2439-47.
- Frischknecht, F. and M. Way (2001). "Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization." Trends Cell Biol **11**(1): 30-38.
- Gerbal, F., P. Chaikin, et al. (2000). "An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion." Biophys J **79**(5): 2259-75.
- Gerbal, F., V. Laurent, et al. (2000). "Measurement of the elasticity of the actin tail of *Listeria monocytogenes*." Eur Biophys J **29**(2): 134-40.
- Giardini, P. A., D. A. Fletcher, et al. (2003). "Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6493-8.
- Hill, T. L. and M. W. Kirschner (1982). "Subunit treadmill of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(2): 490-4.
- Israelachvili (1985). Intermolecular and surface forces. London, Academic Press.
- Kocks, C., J. B. Marchand, et al. (1995). "The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively." Mol Microbiol **18**(3): 413-23.
- Kuo, S. C. and J. L. McGrath (2000). "Steps and fluctuations of *Listeria monocytogenes* during actin-based motility." Nature **407**(6807): 1026-9.
- Lasa, I., E. Guin, et al. (1997). "Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*." Embo J **16**(7): 1531-40.
- Le Clainche, C., D. Pantaloni, et al. (2003). "ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6337-42.
- Liu, X. and G. H. Pollack (2002). "Mechanics of F-actin characterized with microfabricated cantilevers." Biophys J **83**(5): 2705-15.
- Loisel, T. P., R. Boujemaa, et al. (1999). "Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins." Nature **401**(6753): 613-6.

- McGrath, J. L., N. J. Eungdamrong, et al. (2003). "The Force-Velocity Relationship for the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes*." Curr Biol **13**(4): 329-32.
- Merrifield, C. J., S. E. Moss, et al. (1999). "Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells." Nat Cell Biol **1**(1): 72-4.
- Mogilner, A. and G. Oster (1996). "Cell motility driven by actin polymerization." Biophys J **71**(6): 3030-45.
- Mogilner, A. and G. Oster (2003). "Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments." Biophys J **84**(3): 1591-605.
- Noireaux, V., R. M. Golsteyn, et al. (2000). "Growing an actin gel on spherical surfaces." Biophys J **78**(3): 1643-54.
- Pantaloni, D., R. Boujema, et al. (2000). "The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins." Nat Cell Biol **2**(7): 385-91.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, et al. (2001). "Mechanism of actin-based motility." Science **292**(5521): 1502-6.
- Peskin, C. S., G. M. Odell, et al. (1993). "Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet." Biophys J **65**(1): 316-24.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-65.
- Portnoy, D. A., V. Auerbuch, et al. (2002). "The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity." J Cell Biol **158**(3): 409-14.
- Prost, J. (2001). The physics of *Listeria* propulsion. Physics of bio-molecules and cells, Les Houches, France, EDP Science; Springer Verlag.
- Samarin, S., S. Romero, et al. (2003). "How VASP enhances actin-based motility." J Cell Biol **163**(1): 131-42.
- Smith, G. A., J. A. Theriot, et al. (1996). "The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin." J Cell Biol **135**(3): 647-60.
- Taunton, J. (2001). "Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles." Curr Opin Cell Biol **13**(1): 85-91.
- Taunton, J., B. A. Rowning, et al. (2000). "Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP." J Cell Biol **148**(3): 519-30.
- Theriot, J. A., T. J. Mitchison, et al. (1992). "The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization." Nature **357**(6375): 257-60.
- Tilney, L. G., D. J. DeRosier, et al. (1992). "How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement." J Cell Biol **118**(1): 71-81.
- Upadhyaya, A., J. R. Chabot, et al. (2003). "Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4521-6.
- Upadhyaya, A. and A. van Oudenaarden (2003). "Biomimetic systems for studying actin-based motility." Curr Biol **13**(18): R734-44.
- Welch, M. D., A. Iwamatsu, et al. (1997). "Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*." Nature **385**(6613): 265-9.
- Wiesner, S., E. Helfer, et al. (2003). "A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility." J Cell Biol **160**(3): 387-98.

II. Matériel et Méthodes.

Introduction

Le but de ce chapitre est de présenter les techniques utilisées pour réaliser l'expérience. La réussite de cette expérience tient dans la fabrication d'un nouvel outil dédié à cette étude qui est à la fois un support de la polymérisation et un capteur de force: la poignée flexible. La fabrication de ces objets est ici décrite en détail. Enfin, nous décrivons la mise en place finale des expériences.

II.1 Principe du montage expérimental

Afin de pouvoir situer les instruments utilisés, des photographies du montage sont représentées en figures II.1 et II.2 et annotées. Le microscope sur la figure II.1 est placé sur une table anti vibrations. Il est relié à une caméra CCD refroidie (5) (CoolSnap, Princeton Instruments) qui permet la prise d'images traitées par une carte pilotée avec le logiciel Metamorph (Universal Imaging). De part et d'autre du microscope sont disposés deux montages optiques. Un premier permet de manipuler le faisceau d'un laser UV (7) pour le focaliser dans le plan focal de l'objectif du microscope¹. Le second montage optique permet de projeter l'image d'un objet sur un détecteur 2 cadrans connecté à un amplificateur (8)². Un dispositif hydraulique se situe à gauche du microscope. Il sert à appliquer des différences de pression à la micropipette à laquelle il est relié. Les différences de pression sont appliquées grossièrement par une seringue de 5ml (3) et de manière plus précise par une seringue Hamilton (2) dont le piston est fixé à une vis micrométrique. Le passage fin à grossier est réalisé en actionnant une vanne (4).

¹ Voir chapitre I.2.2

² Voir chapitre I.3.2

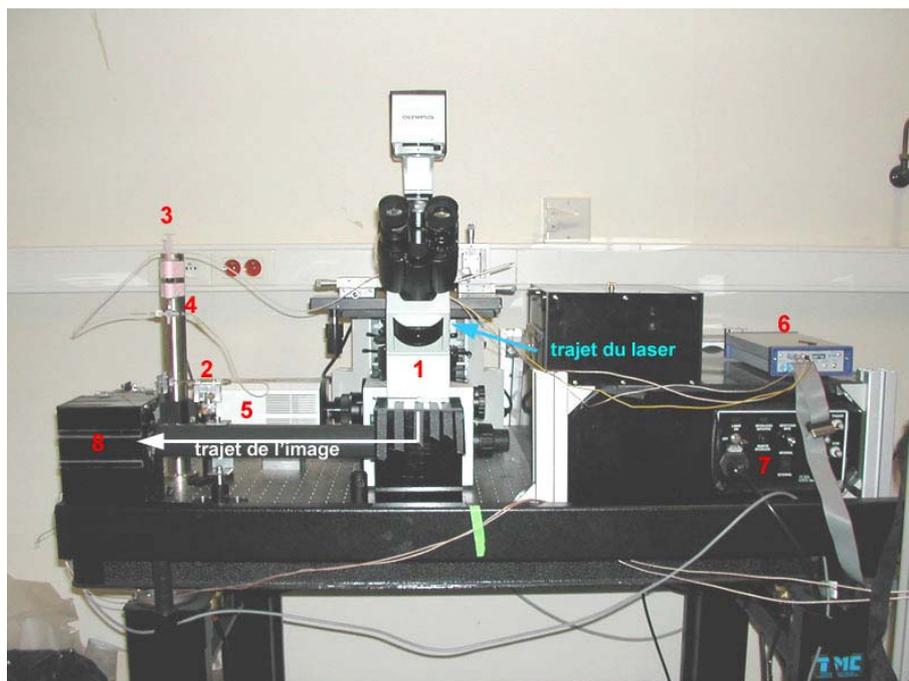


Figure II.1 : Photo de face du montage expérimental.

- | | |
|---|--|
| 1 Microscope | 5 Camera CCD refroidie |
| 2 Pousse-Seringue monté sur micromanipulateur | 6 Amplificateur piezo |
| 3 Seringue | 7 Laser UV |
| 4 Vanne de commutation | 8 Détecteur 2 cadrans et son amplificateur |

Tableau I.1 : Légende de la figure I.1

Le dispositif de micromanipulation proprement dit est illustré par la photographie de la figure II.2. Sur la platine du microscope (6) sont fixés les micromanipulateurs trois axes (1 et 2) qui permettent de manipuler les fibres (7) et les micropipettes (8) au cours de l'expérience. Le porte micropipette (4) est fixé sur une platine piézoélectrique (3) (LISA Physik Instrumente). Cette platine sert à déplacer finement la micropipette dans un axe lors de l'expérience. Elle a une course de $25\mu\text{m}$ et une résolution de l'ordre du nm. Elle est commandée par un amplificateur (6) piloté numériquement par une carte digitale parallèle (National Instruments). Un deuxième piézoélectrique a été monté sur la vis de l'axe Y du micromanipulateur, mais n'est pas présent sur la photographie. Il permet de déplacer les micropipettes

perpendiculairement à l'axe de l'autre piézo. Il possède une course de 30 μ m et est commandé analogiquement en utilisant le curseur placé en façade de son amplificateur.

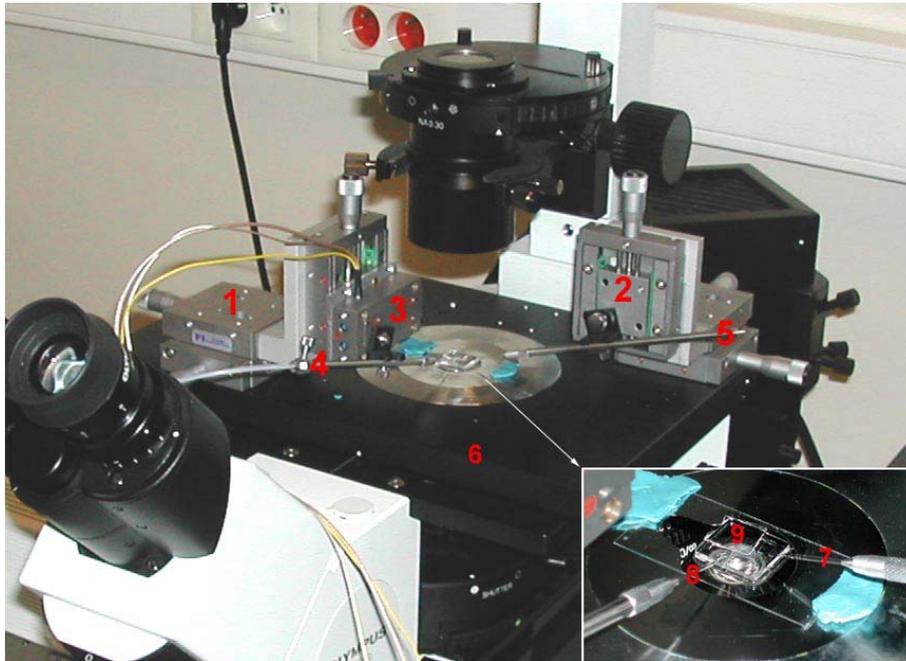


Figure II.2 Détail du montage de micromanipulation.

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1 Micromanipulateur de micropipettes | 6 Platine de microscope manuelle |
| 2 Micromanipulateur de fibres | 7 Fibre |
| 3 Platine Piezoélectrique | 8 Micropipette |
| 4 Porte micropipette | 9 Cellule en PDMS |
| 5 Porte fibre | |

Tableau II.2 Légende de la figure II.2

II.2. Méthodes préliminaires à la préparation du système expérimental

II.2.1 Les Micropipettes

Les micropipettes sont un outil classique de micromanipulation. Elles sont à la base de nombreuses techniques : la manipulation des billes, des fils ou des fibres et l'attachement des comètes. Elles sont préparées à partir de capillaires de borosilicate (Fischer scientifique). Il faut tout d'abord étirer ces capillaires dans une étireuse (P2000 Sutter). Le principe de cet appareil est de chauffer localement le verre (à l'aide d'un faisceau laser infrarouge dans notre cas) et d'en tirer les extrémités en contrôlant la force et la vitesse de tirage jusqu'à la rupture. Avec les paramètres utilisés, on aboutit à deux micropipettes étirées sur environ 1,5 cm dont les extrémités sont fermées et très pointues. Elles peuvent s'utiliser sans modification pour manipuler des fibres ou du fil de platine. Dans les autres cas, il faut les ouvrir. Pour cela, une technique a été mise au point dans le laboratoire d'Evan Evans. Le principe est de plonger la micropipette fermée dans une bille de verre fondue puis de refroidir le verre qui redevient vitreux. La micropipette est prise dans la bille et casse à l'interface bille air si on vient la tirer. Bien sûr, il est nécessaire que la température de transition vitreuse du verre qui constitue la bille soit inférieure à celle du borosilicate dont sont faits les capillaires sans quoi la micropipette fond et perd sa forme. Le verre utilisé est de type « soda lime ». Pour effectuer cette opération, on utilise un appareil appelé microforge (MF 830 Narishige). C'est un petit microscope sur lequel est monté un filament de platine (2cm de long, 100 μ m de diamètre) entre deux électrodes. La bille de verre (quelques centaines de microns de diamètre) est placée autour du filament. La chaleur dégagée par effet joule dans le filament parcouru par un fort courant (1A) fait fondre la bille. Pour que la bille soit stable et ne se déplace pas le long du fil, il faut imprimer au fil une forme de M. La bille vient alors se loger dans le creux du M comme le montre la figure II.3. La bille de verre est installée une fois pour toute et sert pour tous les forgeages. Le connecteur qui relie les électrodes au circuit est monté sur un micromanipulateur. La micropipette est elle aussi montée sur un micromanipulateur qui permet d'aligner sous microscope la pointe avec la bille. Pratiquement, il est quasiment impossible de mettre en forme le fil de platine de manière symétrique de telle sorte que lorsqu'il est chauffé ou refroidi, il se dilate ou se rétracte parallèlement à la micropipette. En conséquence, celle-ci ne se casse pas de manière nette et présente souvent une extrémité biseautée. Pour s'affranchir de ce problème, on procède en deux étapes. On vient casser une

première fois la pipette pour y ménager une ouverture. Ensuite, on réintroduit celle-ci dans le verre fondu. Si on chauffe suffisamment pour que le verre fondu soit peu visqueux, il monte dans la micropipette par capillarité. Lorsque l'on arrête le chauffage et qu'on tire, la micropipette casse exactement sur le ménisque de verre soda qui est nécessairement perpendiculaire aux bords (Fig II.3). On obtient ainsi une extrémité bien droite et aux bords nets. De plus, si le verre soda est assez visqueux lors de la montée, on peut contrôler la hauteur du ménisque avec précision et choisir ainsi le diamètre intérieur de la micropipette qu'on obtient. En observant au x60 et en utilisant le réticule présent sur l'oculaire on travaille à une précision inférieure au μm . Le diamètre intérieur des micropipettes utilisées varie entre $1,5\mu\text{m}$ et $5\mu\text{m}$ suivant l'application.

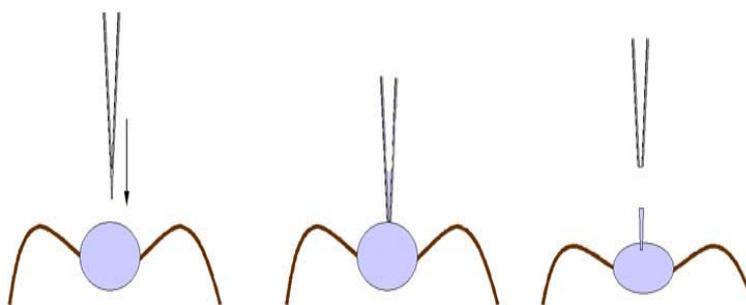


Figure II.3 : schéma de la séquence d'un forgeage de micropipette

Les micropipettes utilisées pour manipuler les comète doivent subir une dernière transformation. Pour permettre une meilleure manipulation des comètes (voir II.1), le bout de ces micropipettes est refermé sur une ouverture de $1,5\mu\text{m}$. Pour obtenir de telles pipettes, il suffit de les couper comme expliqué précédemment puis de faire fondre le bout de la micropipette en plaçant le filament à distance ($30-50\mu\text{m}$) et en envoyant un courant plus fort. L'extrémité de la micropipette se referme progressivement et on coupe le chauffage lorsque l'ouverture restante est satisfaisante. Un exemple d'une telle micropipette est montré sur la figure II.4

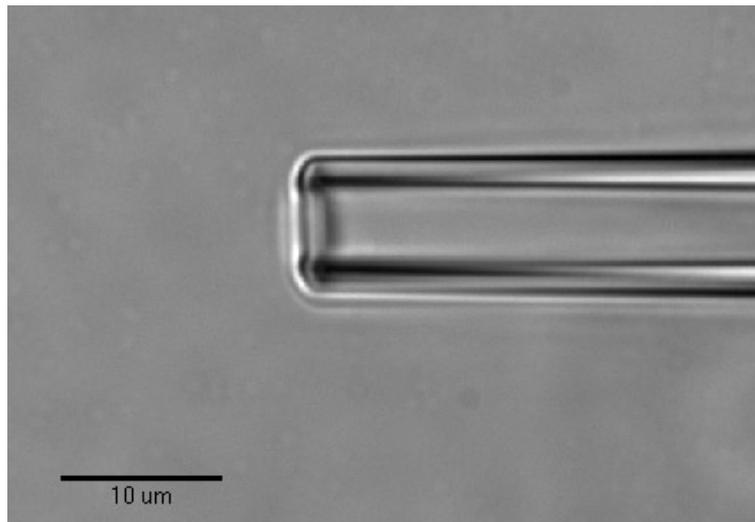


Fig. II.4 Micropipette de coating (diamètre intérieur 4.5 μ m)

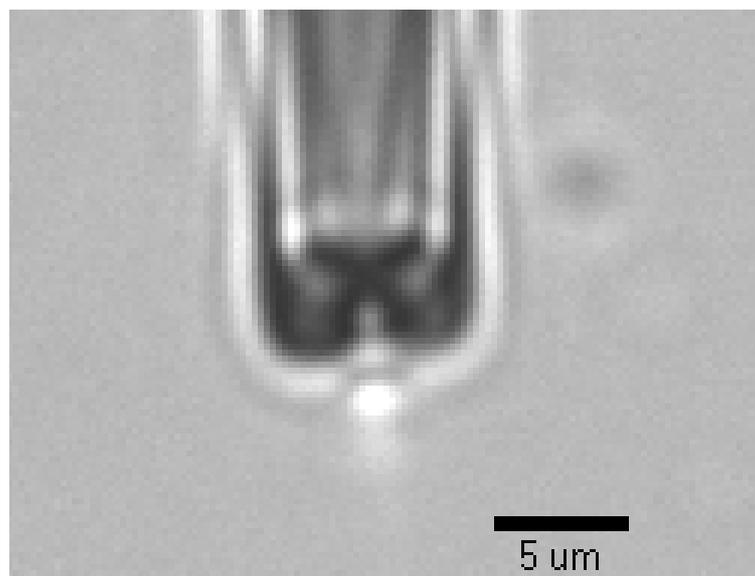


Fig. II.5 Micropipette de manipulation de comète (diamètre intérieur 4.5 μ m, ouverture 1.5 μ m)

II.2.2. Le Collage Optique

Pour pouvoir assembler des objets comme des billes et des fibres, on utilise le collage optique. La colle utilisée est une résine photoréticulable (NOA68 Norland Products) sous l'action d'une lumière ultraviolette. Elle est communément utilisée en optique pour assembler des lentilles par exemple. Dans ce cas, le collage est effectué en irradiant la surface de contact à l'aide d'une lampe UV pendant plusieurs minutes. Mais lorsque que l'on veut réaliser un assemblage à l'échelle microscopique, deux facteurs importants sont incompatibles avec

l'utilisation de ces lampes encombrantes. Tout d'abord, il est très avantageux de n'irradier que localement pour ne pas polymériser la colle hors de la surface de contact (qu'il s'agisse de bavures ou d'un réservoir de colle où l'on vient tremper les objets). Deuxièmement, il est important de fixer l'assemblage dès le positionnement effectué pour un meilleur contrôle. Pour ces deux raisons, un laser UV focalisé est un instrument de choix car il concentre une forte puissance sur une petite surface permettant ainsi un collage local rapide.

II.2.2.a Focalisation du laser UV

Le laser utilisé est un laser à azote pulsé 337nm (Laser Science Inc.). Cette longueur d'onde se situe dans la bande d'absorption du photo-initiateur de la colle. Afin d'obtenir un spot laser dont la taille est de l'ordre du micron, la lumière est concentrée dans le plan focal d'un objectif monté sur le microscope. Cette opération est réalisée grâce au montage schématisé sur la figure II.6. Le faisceau est rendu circulaire par le diaphragme (1), puis atténué par le premier filtre. Il est ensuite agrandi par un télescope constitué de deux lentilles conjuguées ayant une distance focale respective de 50mm et 200mm. On obtient ainsi en sortie un faisceau parallèle dont la section est agrandie d'un facteur 4. Cette opération est importante car plus le faisceau est large plus le point focal sera petit. En pratique, on s'assure que le faisceau couvre toute la surface utile de sortie de l'objectif. En sortie du télescope, un périscope permet de projeter le faisceau sur une tirette usinée au laboratoire qui possède un réceptacle à 45° percé d'un trou sur lequel est collée une lame séparatrice. Cette lame réfléchit le faisceau sur l'arrière d'un objectif 40X UV (NA 1.4 UAPO 340 Olympus) qui a une bonne transmission à 340nm. Cet objectif focalise le faisceau en un point du plan focal objet. La surface du spot est en théorie seulement limitée par l'ouverture numérique de l'objectif. Mais le laser n'étant pas de grande qualité, le parallélisme du faisceau n'est pas excellent et il influence aussi sur la taille. Entre le périscope et la tirette, on peut placer une densité neutre amovible pour réduire la puissance du laser. Elle est en place pour le collage et n'est retirée que lorsqu'on veut découper des objets. La figure II.7 donne une indication du profil d'intensité du spot. Pour le réaliser, de la fluorescéine cagée a été placée entre lame et lamelle. La préparation est ensuite imagée en fluorescence. Une fois le laser déclenché, la molécule cageante libère la fluoresceine sous l'action des photons UV. L'image de la figure a été prise environ 200ms après le déclenchement du laser. Elle ne donne qu'une taille maximale pour le spot laser car la diffusion du fluorophore opère pendant ce laps de temps.

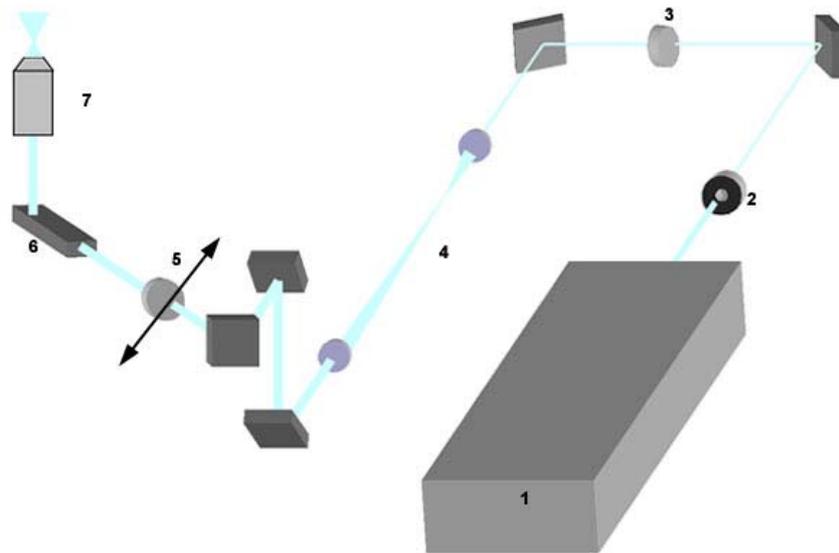


Figure II.6 Montage optique de focalisation du laser

- | | | | |
|---|-------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | Laser UV | 5 | Filtre de densité neutre mobile |
| 2 | Diaphragme | 6 | Lame semi réfléchissante amovible |
| 3 | Filtre de densité neutre fixe | 7 | Objectif 40X UV |
| 4 | Télescope | | |

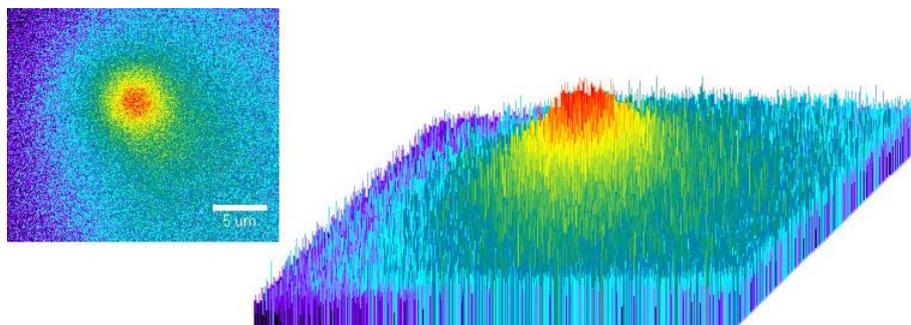


Fig.II.7 Image et profil d'intensité d'un fluorophore cagé libéré après irradiation laser (barre 5 μm).

II.2.2.b Repérage du Spot Laser

Il est difficile d'observer la lumière laser directement à la caméra dans les conditions d'atténuation compatibles avec le collage. Mais il existe un moyen beaucoup plus pratique pour repérer le spot afin de le faire ensuite coïncider avec la zone de collage. Il suffit d'étaler une fine couche de colle sur une lamelle puis de déclencher le laser quelques secondes. Le faible changement d'indice optique ainsi que les contraintes créées dans la couche par la solidification à l'endroit du spot permettent de repérer la position du laser très facilement comme la figure II.8 l'illustre. Cette position est fixe dans le repère du microscope. La région de l'image correspondant à cette position est ensuite entourée d'un cercle qui sera accolé aux images suivantes comme repère de la position du laser.

II.2.2.c Collage

Les détails de réalisation des assemblages seront développés par la suite car ils sont spécifiques aux objets à fixer. Une fois cet assemblage effectué, on déplace la platine sur laquelle tous les micromanipulateurs sont montés pour faire coïncider la zone de contact avec la position du spot qui, elle, est fixe. Ainsi on ne risque pas de déplacer les objets les uns par rapport aux autres. Enfin on illumine quelques secondes en déclenchant le laser. On utilise toujours la fréquence de répétition maximale qui est de 30Hz. Seul l'objectif 40X 340nm permet de réaliser ce collage ce qui limite la précision optique et la distance de travail.

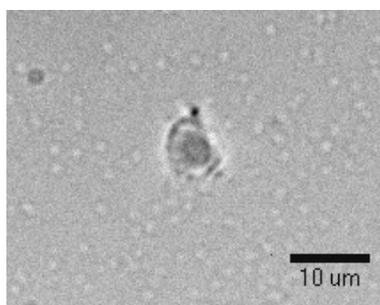


Fig. II.8 Repérage du spot laser sur une fine couche de colle. Seule la partie centrale a été polymérisée.

II.2.3. Préparation des fibres flexibles

Les fibres sont les objets qui vont permettre de mesurer des forces grâce à leur flexibilité. Deux types de fibres sont utilisées suivant la rigidité voulue: les fibres étirées et les microfibres, plus flexibles.

II.2.3.a Les fibres étirées

Elles sont fabriquées à partir de bâtonnets de verre ($\varnothing 1\text{mm}$, World précision Instruments). Lors de la préparation, il faut contrôler non seulement la forme des aiguilles mais aussi leur flexibilité. Il faut faire en sorte que la « zone utile » c'est-à-dire la longueur déformée par la gamme de force de l'expérience soit de quelques dizaines de microns. Si elle est trop faible, la zone de linéarité de l'élasticité est trop faible et la bille suit une trajectoire trop courbe au cours de la déformation. Si elle est trop longue, les aiguilles sont difficilement manipulables dans les liquides car leur temps de relaxation est trop grand. Les bâtonnets sont tout d'abord étirés de la même manière que les micropipettes mais le contrôle des paramètres d'étirage est beaucoup plus strict. Avec notre étireuse, il n'est pas possible de fabriquer les aiguilles avec une seule étape d'étirage. En effet, pour aboutir directement à la bonne flexibilité et à la bonne géométrie on arrive à un jeu de paramètres pour lequel les tirages ne sont pas reproductibles et les aiguilles souvent tordues. On a donc fait le choix de préparer par étirage des aiguilles moins flexibles avec un jeu de paramètres reproductibles³ puis de leur faire subir d'autres étapes pour diminuer leur rigidité. Le tirage final de l'étireuse engendre une extrémité très conique d'une dizaine de microns de diamètre. Ce cône final est indésirable car il introduit des variations dans la flexibilité ainsi que des non linéarités. Toujours dans un souci de reproductibilité, on retire cette extrémité à l'aide de la microforge. Pour cela, on plonge la partie très conique dans la bille de verre fondue, on refroidit et on coupe l'aiguille pour aboutir à une extrémité franche de $1.5\mu\text{m}$ de diamètre. L'aiguille a maintenant la bonne forme mais elle est trop rigide. Pour la rendre plus flexible tout en gardant la géométrie, on la plonge dans de l'acide fluorhydrique à 8% pendant 8 à 12 minutes. L'acide ronge le verre de manière uniforme et affine la fibre (Cluzel, Lebrun et al. 1996). En jouant sur le temps, on

³ Heat : 260 Fil : 4 Vel : 60 Del : 155 Pull : 180

peut faire varier le diamètre des aiguilles et donc leur rigidité. On obtient ainsi des fibres de verre dont la rigidité est contrôlable⁴ et se situe entre 0.5 et 3nN/ μ m.

II.2.3.b Les microfibres

Les aiguilles dont la rigidité est inférieure à 0.5nN/ μ m sont trop fragiles et un autre type d'objet doit être utilisé pour de plus grandes flexibilités : les microfibres. Elles sont fabriquées à partir de laine de verre (Lausha Fiber, Allemagne), constituée de filaments de verre de dimensions variables (0,3 à 5 μ m de diamètre et 10 à 500 μ m de longueur). Cette laine de verre est tout d'abord dispersée dans de l'eau pure en pipetant fortement et éventuellement en plongeant la solution dans un bain d'ultrasons. Cette solution est ensuite déposée dans une cellule constituée de deux bandes de PDMS de 1mm d'épaisseur déposée parallèlement entre deux lamelles. On laisse sécher la cellule pour que le ménisque peigne les fibres et les oriente grossièrement parallèlement aux bandes de PDMS. On retire ensuite la lamelle qui couvre la cellule ainsi que les bandes de PDMS pour enfin disposer d'une population hétérogène de microfibres étalées sur une lamelle avec une orientation préférentielle. L'étape suivante consiste à venir coller une de ces microfibres dans une micropipette pour pouvoir ensuite la micromanipuler. Pour ce faire, on place de la colle optique à un endroit de la lamelle où il n'y a pas de fibres. On vient ensuite tremper dans la colle une micropipette qu'on a préalablement forgée à un diamètre intérieur de 2 μ m environ. La colle rentre dans la micropipette par capillarité. On choisit ensuite une microfibre d'une centaine de microns de long et d'un diamètre de 0.5 μ m environ. La micropipette est alors placée à proximité de la fibre parallèle à celle-ci. À l'aide d'une aiguille (micropipette fermée), celle-ci fermée, on vient soulever le bout de la microfibre qu'on fait rentrer dans la colle en avançant la micropipette. L'étape finale consiste à réticuler la colle pendant une trentaine de seconde. Le résultat final est illustré par la figure II.9. où la microfibre mesure 73 μ m de long pour un diamètre de 0.7 μ m. Le désavantage de ces microfibres est qu'il est extrêmement difficile d'en trouver des parfaitement droites. De plus, leur temps de relaxation est très élevé et elles sont donc plus difficiles à manipuler dans les liquides que les aiguilles. Elles sont par contre beaucoup moins cassantes. Les rigidités obtenues sont beaucoup plus variables (elles dépendent bien évidemment des dimensions et donc du choix de la microfibre).

⁴ voir le chapitre calibration

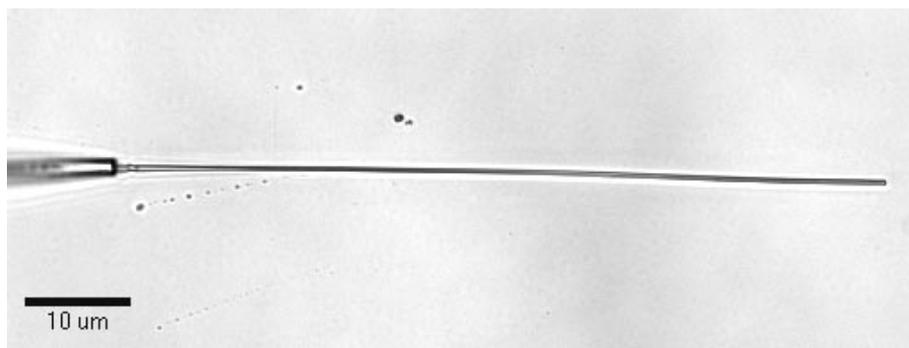


Fig.II.9 Microfibre de verre collée dans une micropipette.

II.3 Les Poignées Flexibles

Les poignées flexibles sont les objets les plus importants de l'expérience. Elles servent à la fois de substrat de l'activateur de polymérisation et de senseur de force. Elles sont fabriquées en collant une bille sur une fibre flexible puis calibrées en rigidité. Enfin la bille est recouverte de la protéine activatrice.

II.3.1 Préparation des poignées flexibles

Le collage d'une bille sur une pointe d'AFM a déjà été réalisé soit par chauffage de la bille avec un laser, soit en utilisant une colle epoxy longue à polymériser. Toutefois, ces techniques n'étaient pas directement adaptables dans notre cas, la pointe d'AFM n'étant pas un instrument adapté. D'autre part, il est extrêmement important de contrôler la géométrie du collage car elle conditionne à la fois la géométrie de croissance de la comète et la direction d'application de la force sur le couple bille comète. L'axe formé par la bille et le point de colle doit pour cela être perpendiculaire à la fibre. Il faut par ailleurs minimiser la surface de collage pour faire en sorte que le maximum de surface de bille soit disponible pour être recouvert. Il a donc fallu mettre au point une technique qui permette d'effectuer un collage précis qui satisfasse à ce cahier des charges. Le principe de cette technique est d'utiliser une micropipette pour attraper une bille dans l'eau puis de venir, dans l'air, l'appliquer sur un point de colle se trouvant sur la fibre et enfin de faire réticuler la colle en l'irradiant avec le laser.

II.3.1.a Disposition des objets

On découpe dans du PDMS d'un mm d'épaisseur un cadre dans lequel on pratique un petit canal puis on le colle sur une lamelle de microscope (voir figure II.10). On y introduit une solution de billes de polystyrène de $2\mu\text{m}$ dans l'eau qui constitue le réservoir où l'on va venir chercher les billes à coller. Une goutte de colle de quelques centaines de microns de diamètre est disposée en face du canal à environ un demi centimètre. Une micropipette forgée à un diamètre intérieur de $1.5\mu\text{m}$ est insérée dans le porte micropipette connecté au dispositif hydraulique et monté sur son micromanipulateur. On place une fibre flexible dans son porte fibre lui-même fixé sur son micromanipulateur.

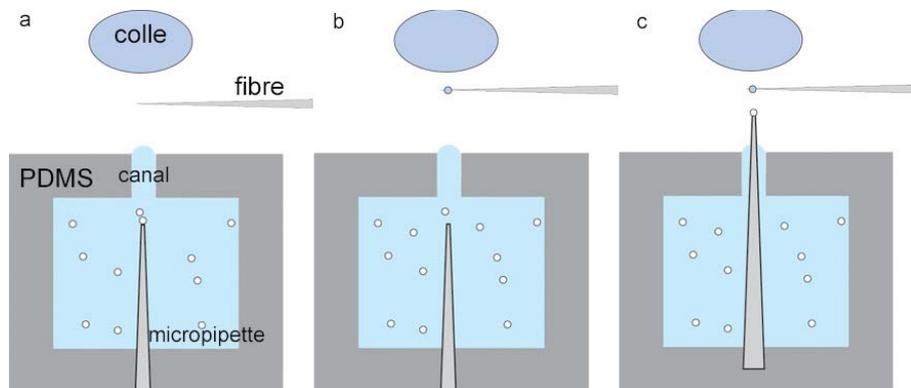


Fig. II.10. Collage de la bille : préliminaires. a : disposition des objets. b : point de colle. c : approche de la bille

II.3.1.b Dépôt de colle sur la fibre

Pour obtenir un compromis entre une surface minimale de colle sur la bille et un attachement suffisant, il est nécessaire de fabriquer au préalable une petite bille de colle réticulée sur la fibre. Par ailleurs, cette petite bille crée un espacement entre la bille et la fibre qui s'avère très utile lors du « coating », comme on le verra plus loin. On vient plonger l'extrémité de la fibre dans un endroit proche de la ligne de contact lamelle-colle-air de la goutte de colle. La fibre est ensuite retirée rapidement en utilisant le déplacement vertical pour entraîner un film de colle. La colle étant non mouillante, une instabilité de Rayleigh se produit et un chapelet de gouttes décore l'extrémité de la fibre. Il est possible de modifier la taille des gouttes en variant la vitesse d'extraction de la fibre, l'épaisseur du film entraîné étant une fonction croissante de la vitesse (Landau). On place ensuite la goutte la plus proche de l'extrémité en coïncidence avec la position du laser et on la fait réticuler quelques secondes. En replongeant la fibre dans la colle et en la retirant doucement, on élimine les gouttes non réticulées. La vitesse

d'extraction est ensuite augmentée lorsque la bille de colle arrive à proximité de l'interface colle air pour qu'un film de colle non réticulé se place sur la bille et seulement à cet endroit. C'est ce film qui va servir à la fixation de la bille de polystyrène.

II.3.1.c Assemblage et Collage

Pour manipuler une bille, l'utilisation d'une micropipette est maintenant répandue (Merkel, Nassoy et al. 1999). En exerçant une dépression avec la seringue, une bille vient se bloquer à l'extrémité de la micropipette immergée. La bille est ensuite retirée de la solution en déplaçant la micropipette à travers l'interface eau air en sortie du canal creusé dans le PDMS (voir la figure II.10). Pour ne pas que la bille s'échappe de la micropipette sous l'action de la force capillaire, il faut que l'interface soit perpendiculaire à la micropipette et déplacer celle-ci très rapidement. L'assemblage est illustré par les images de la figure II.11. La bille est mise en regard avec le point de colle sur la fibre (A) puis mise en contact (B). On vient faire coïncider la bille de colle avec le spot laser en déplaçant la platine du microscope. La colle est réticulée pendant une dizaine de secondes par le laser UV (C). Enfin, en exerçant une forte surpression à l'aide de la seringue, la bille est expulsée de la micropipette et reste fixée à la fibre(D).

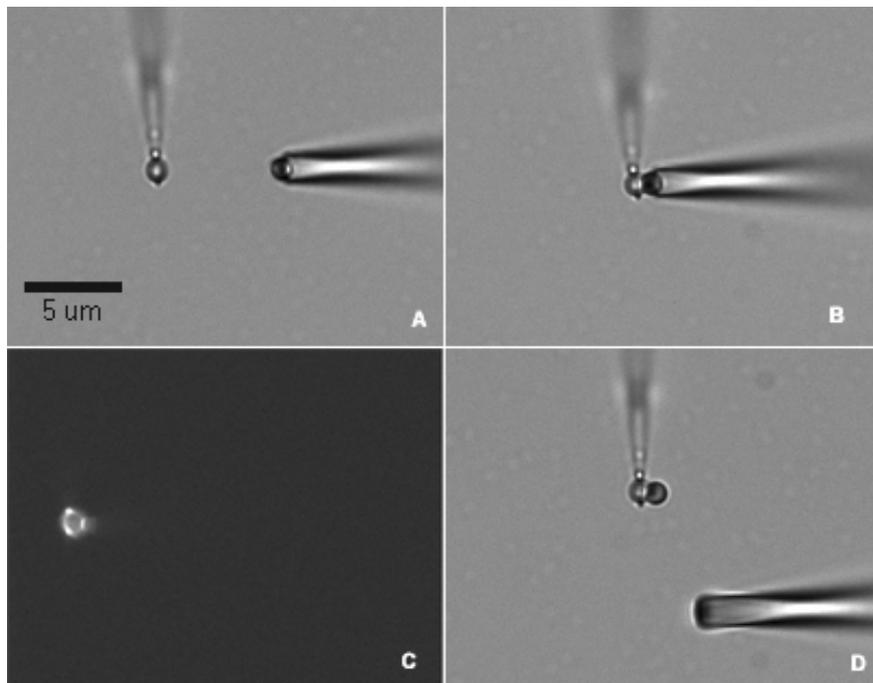


Fig. II.11 Séquence de collage d'une bille sur une fibre flexible. A : approche de la bille. B : mise en contact. C : irradiation UV. D : libération de la bille collée.

II.3.2 Calibration

Pour calibrer la rigidité des fibres, il existe différentes techniques mais la plus précise consiste à mesurer leurs fluctuations thermiques (Howard and Hudspeth 1987). La présence au laboratoire d'un appareil effectuant cette mesure nous a poussé à utiliser cette méthode en réalisant un montage similaire à celui de Pascal Martin à l'Institut Curie. Malheureusement, la trop grande rigidité et le manque de contraste de nos fibres ne permettent pas de faire des mesures avec cette méthode directement sur les poignées flexibles. C'est pourquoi on utilise un fil de platine comme intermédiaire. On en mesure sa rigidité avec la méthode des fluctuations et on compare ensuite la rigidité des poignées avec celle de ce fil.

II.3.2.a Préparation et collage du fil de platine

Du fil de platine de $0,6\mu\text{m}$ de diamètre enrobé d'une épaisse gaine d'argent ($\sim 100\mu\text{m}$), conçu pour réaliser des sondes thermiques est utilisé. Pour dénuder le fil, on coupe quelques millimètres du fil gainé qu'on fixe ensuite sur une lamelle de verre. On attaque ensuite le fil à l'acide nitrique à 60% qui ronge l'argent en l'oxydant en Ag^+ . Après rinçage à l'eau, la lamelle est placée sous microscope. Le fil est ensuite découpé à l'aide du laser, en enlevant le filtre de densité neutre pour obtenir une forte puissance: on place l'endroit à couper en coïncidence avec le spot laser ; le platine qui absorbe les UV est chauffé localement il se casse exactement à l'emplacement du spot. On peut ainsi découper un bout de fil à la longueur voulue ($\sim 200\mu\text{m}$). Avec une micropipette fermée, utilisée ici comme une simple aiguille, on vient ensuite coller ce bout de fil perpendiculairement à l'axe de la pipette. On soulève une extrémité du fil avec la pointe de la micropipette et on le fait glisser jusqu'à une goutte de colle placée sur l'aiguille. Cette goutte est polymérisée avec le laser (cette fois atténué en remettant le filtre). Le fil est ainsi fixé à l'aiguille (voir figure II.12) et peut être manipulé. L'utilisation de ces fils pour fabriquer des poignées aurait été extrêmement avantageuse en terme de reproductibilité et de simplicité (calibration directe). Malheureusement, les fils ainsi fixés sont très peu manipulable car la plasticité du platine est telle qu'ils se tordent très facilement à la traversée d'une interface. Il est nécessaire de fabriquer un nouveau fil collé pour chaque lot de poignées flexibles car ce dernier n'est plus utilisable dès qu'on le retire du micromanipulateur.

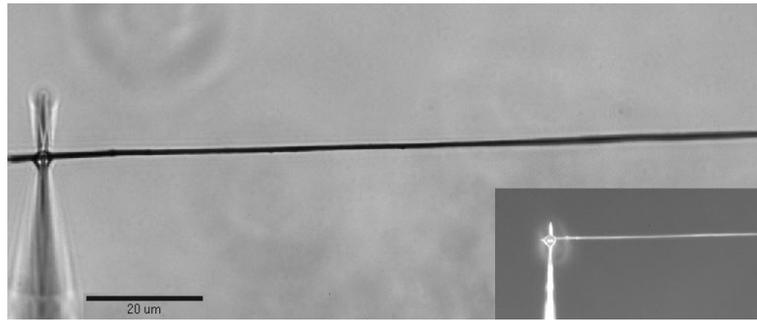


Fig. II.12 Fil de platine collé. Vue au 40x et au 10x (encart en bas à droite)

II.3.2.b Calibration du Fil de Platine

Le fil de platine est calibré en mesurant l'amplitude des fluctuations de son extrémité et en ajustant leur spectre de puissance. On effectue cette mesure dans l'eau pour éviter de récupérer les fluctuations dues aux courants d'air. Les déflexions du fil sont mesurées en utilisant le montage décrit par le schéma de la figure II.13. L'aiguille sur laquelle est collée le fil est immergée dans l'eau entre deux lamelles. On y ajoute un peu de tensioactif pour éviter que le fil ne se torde sous l'action de la force capillaire à la traversée de l'interface eau air. L'extrémité du fil est imagée par le microscope en utilisant l'objectif 40X UV et la tirette de grossissement 1.5 du microscope. On utilise la sortie photo pour récupérer l'image qu'on veut projeter (elle ne fournit pas une image à l'infini mais c'est la seule disponible). Le faisceau est agrandi par un dispositif optique commercial (Navitar) et enfin projeté sur un détecteur 2 cadrans (UDT sensors). L'agrandissement total est de 1000 environ.

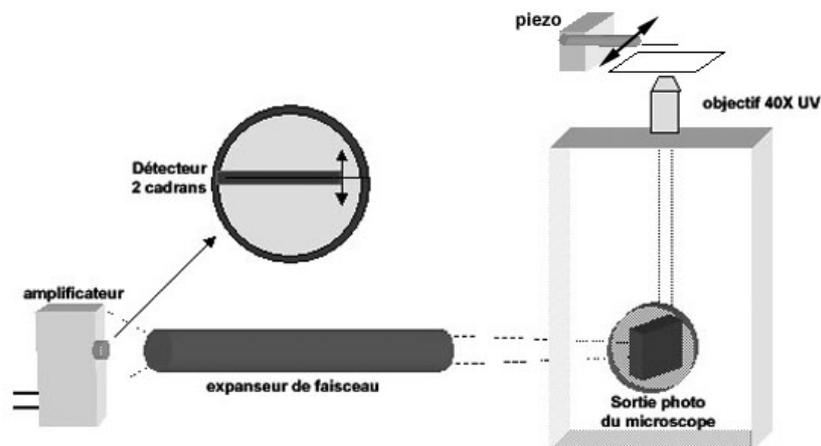


Fig II.13 Schéma de la projection du fil sur le détecteur

Le signal mesuré sur chaque cadran du détecteur passe par un préamplificateur qui effectue la conversion courant-tension. Chaque tension obtenue est ensuite elle-même amplifiée par un amplificateur à gain variable pour adapter le signal de sortie à l'éclairage. Les signaux sont ensuite échantillonnés par une carte d'acquisition (National Instruments) et traités avec le logiciel Labview. Le signal utile est la différence de tension entre chaque cadran normalisée par leur somme pour s'affranchir des fluctuations de l'éclairage. La micro-aiguille sur laquelle est collé le fil est montée sur le piézoélectrique numérique qui offre un déplacement perpendiculaire à l'axe du fil. Avant chaque mesure, il faut calibrer le montage pour obtenir le rapport Volt/micron qui varie suivant les paramètres géométriques du fil et l'éclairage. Un premier balayage de 25µm du piezo est réalisé pour repérer la position du piézo pour laquelle la projection du fil se trouve au centre du détecteur. Un second balayage de 0.2µm est ensuite effectué autour de cette position avec des incréments de 5nm. L'ensemble des points obtenus se distribuent sur une droite dont la pente fournit la calibration. Le coefficient varie entre 0.45 et 0.7 V/µm suivant les fils et la position de l'extrémité le long du gap entre les cadrans. Avant la mesure de fluctuation, la variance du bruit est mesurée sur le détecteur seul. Elle varie de 10 à 100 nm² ce qui équivaut à une erreur moyenne due au bruit de l'ordre de 3 à 10nm environ. Le fil est enfin replacé sur la position médiane pour pouvoir procéder à la mesure proprement dite. L'acquisition et l'analyse sont réalisées à l'aide d'un programme Labview développé par le groupe de Jim Hudspeth (Rockefeller, New York) qui a été modifié pour s'appliquer à ce montage et dont la fenêtre de commande est représentée sur la figure II.14. La position de l'extrémité est suivie lors de 10 séquences de 1s à une fréquence de 250kHz (graphique du haut). Pour chaque séquence, le spectre de puissance est calculé. À la fin de ces séquences, on moyenne les spectres obtenus et on trace la densité du spectre moyenné. Si on écrit l'équilibre des forces appliquées à une fibre flexible dans un liquide dans des conditions à bas nombre de Reynolds, on a :

$$kx(t) - \lambda \dot{x}(t) = \xi(t)$$

où k est la rigidité, λ la viscosité et ξ est la force instantanée due à l'agitation thermique. La transformée de Fourier de cette équation nous donne :

$$X(\omega) = \chi(\omega)\Xi(\omega)$$

où $\chi(\omega) = \frac{1}{k - i\omega\lambda}$ est la fonction de réponse, $X(\omega)$ et $\Xi(\omega)$ sont les transformées de Fourier de $x(t)$ et de $\xi(t)$. D'après le théorème de fluctuation dissipation, on peut relier la transformée de Fourier de la fonction de corrélation à la température et à la fonction de réponse

$$TF(\langle X(t)X(t+\tau) \rangle) = C_{XX}(\omega) = 2k_B T \frac{\text{Im}(\chi(\omega))}{\omega}$$

(Chaikin and Lubensky 1997)

On peut donc en déduire:

$$C_{XX}(\omega) = 2k_B T \frac{\tau/k}{1 + (\tau\omega)^2}$$

où τ est le temps de relaxation de la fibre. On peut ainsi ajuster la densité de puissance avec cette Lorentzienne pour obtenir la valeur de la rigidité et du temps de relaxation. L'ajustement est représenté par la courbe rouge du graphique du bas dans la fenêtre de commande (figure II.14). En représentation log-log, cette courbe est un plateau aux basses fréquences et une droite de pente -2 aux hautes fréquences. Dans cet exemple, il s'agit d'un fil très long et donc très flexible. En pratique, les fils de platine utilisés sont plus courts pour avoir une rigidité plus proche des poignées à calibrer. Cela a une conséquence sur la forme du signal. L'amplitude du plateau est proportionnelle au rapport τ/k tandis que la fréquence de coupure (c'est à dire la fréquence pour laquelle on passe à l'autre régime) est $1/\tau$. Plus le fil est court, plus sa raideur et son temps de relaxation diminue et par conséquent plus la hauteur du plateau diminue. Cette tendance devient gênante pour l'ajustement. En effet, si la hauteur diminue, elle est de plus en plus proche du niveau de bruit. Le signal aux hautes fréquences se redresse pour ensuite suivre le bruit comme illustré sur la figure II.15. Pour cette figure, on a artificiellement diminué le rapport signal sur bruit (en diminuant l'intensité de la lumière) pour rendre compte de ce phénomène. On remarque aussi que pour des fibres plus rigides, apparaît un pic à 90Hz qui vient encore gêner la comparaison.

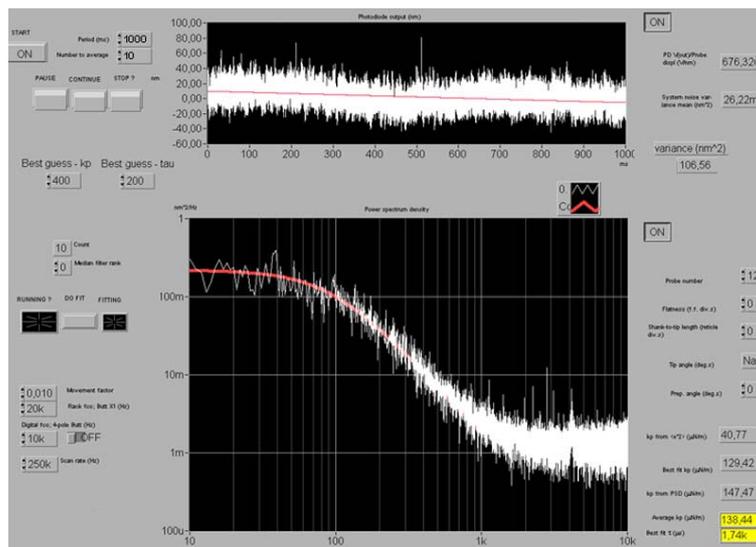


Fig. II.14 : Fenêtre de commande du programme de calibration. Le graphique du haut représente une séquence des fluctuations. Le graphique du bas est la densité spectrale de puissance moyennée ainsi que le fit correspondant.

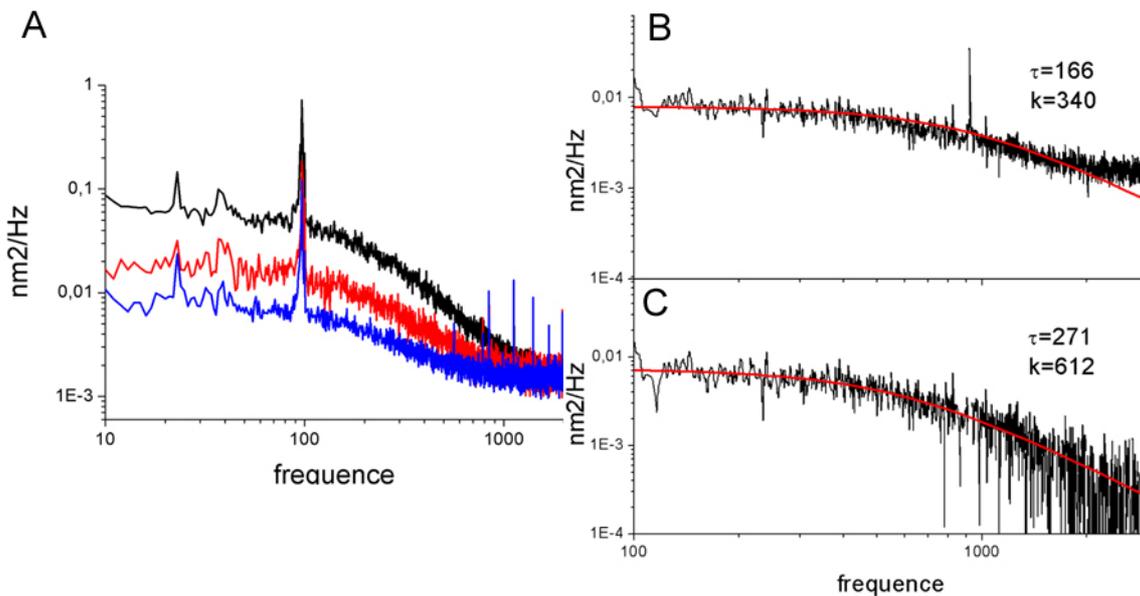


Fig. II.15 A : simulation d'un raccourcissement de la fibre. L'intensité de la lumière est diminuée de la courbe noire à la courbe bleue (les courbes sont ensuite normalisées pour avoir un bruit équivalent). B : Fit du spectre brut. C : fit du spectre recalculé auquel les pics ont été retirés.

Tous ces phénomènes font que le fit du spectre brut donne une sous estimation de la raideur. Pour résoudre ce problème, on retire la courbe de bruit de détection du spectre brut. Cette courbe de bruit de détection est obtenue en mesurant le spectre sans fibre. Elle est ensuite ajustée à la valeur du bruit de détection de chaque spectre brut (le niveau varie pour chaque

fibre car il dépend du rapport Volt/micron qui est fibre dépendant). Ainsi, on peut avoir une estimation du spectre des fluctuations thermiques que l'on va maintenant ajuster pour déterminer les paramètres de la Lorentzienne. Un exemple d'une telle procédure est illustré par la figure II.15.C. Si l'on veut avoir une estimation de l'erreur entre la fit et la courbe recalculée, un bon moyen est de calculer l'intégrale du spectre sur la zone ajustée et de la comparer avec la valeur calculée par la formule :

$$\int_{f_1}^{f_2} 2kT \frac{\tau/k}{1+(\tau\omega)^2} df = \frac{kT}{\pi k} (A \tan(2\pi f_2) - A \tan(2\pi f_1))$$

Une telle estimation donne lieu à des erreurs sur la raideur comprises entre 5 et 30% suivant les fibres.

II.3.2.c Calibration des poignées flexibles avec le fil

Les poignées flexibles sont maintenant calibrées par comparaison avec le fil de platine dont on a mesuré la rigidité. En laissant le fil collé en place, la poignée est montée sur le micromanipulateur opposé. Le fil et la fibre, ainsi disposés parallèlement, sont mis en contact de telle sorte que l'extrémité du fil appuie sur la bille de colle pour ne pas dégrader la surface de la bille (voir les images de la figure II.16) et visualisé avec un objectif 100X. Le déplacement piézoélectrique numérique est déplacé de 10µm avec des incréments de 0.2µm pour chacun desquels la position de la bille de polystyrène est repérée avec le programme de tracking de Metamorph (points verts sur la séquence d'images). Seule l'abscisse de la position est utilisée pour mesurer la force. Cette convention est utilisée tout au long des expériences. Elle induit une erreur faible sur la rigidité. L'abscisse mesurée X est tracée en fonction de la course du piezo x. La pente de l'ajustement linéaire permet de remonter à la rigidité réduite. En effet si on écrit l'équilibre des forces entre le fil et la poignée :

$$k_f(x - X) = k_p X$$

où k_f et k_p sont les rigidités respectives du fil et de la fibre. En dérivant X par rapport à x, on en déduit la formule qui donne la rigidité :

$$k_p = k_f \frac{1 - dX/dx}{dX/dx}$$

Les rigidités obtenues sont dans une gamme de 0,8 à 4nN/ μ m pour les poignées réalisées à partir de fibres étirées et de 0,2 à 0.8nN/ μ m à partir de microfibres.

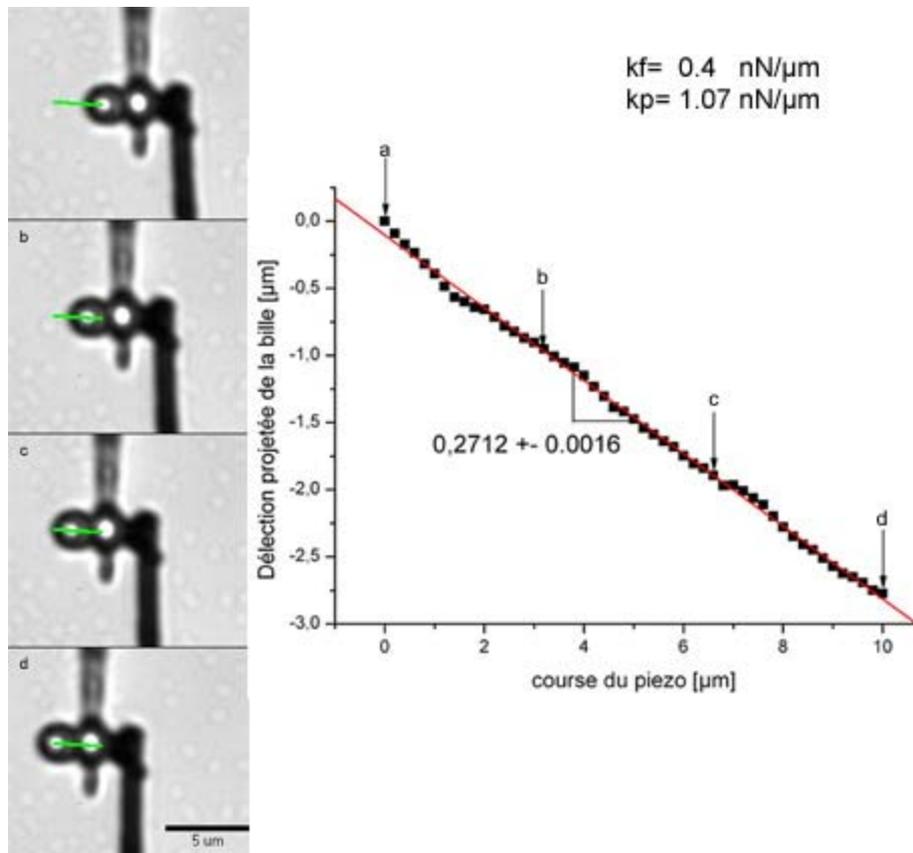


Fig. II.16 Calibration d'une poignée avec un fil de platine

II.3.3 Coating de la bille

Il faut maintenant recouvrir la bille de l'activateur qui catalysera la polymérisation de l'actine à la surface. Il est possible de coller une bille déjà couverte sur une fibre juste avant l'expérience. Elle engendrera une comète une fois placée dans la solution de protéines. Mais l'ensemble des manipulations (séchage, élévation de la température sous UV) risquent de dénaturer la protéine. On perd ainsi le contrôle de la quantité d'activateur présent à la surface. Il est donc nécessaire de mettre au point une technique moins dénaturante pour la protéine offrant par là une plus grande reproductibilité. Cette technique consiste à recouvrir la bille de protéines après le collage, juste avant une expérience, à l'aide d'une micropipette. Une

poignée est disposée sur le micromanipulateur de fibres puis immergée dans une goutte d'eau placée sur une lamelle afin de la nettoyer. Une micropipette forgée à un diamètre intérieur de 4 à 5 μm environ est remplie d'une solution de protéines activatrices à l'aide d'un capillaire muni d'une seringue (microfill, World Precision Instruments). Cette micropipette est ensuite introduite dans le porte micropipette relié au dispositif de pression et fixé au deuxième micromanipulateur. Le dispositif de pression a été préalablement rempli du même tampon que celui utilisé pour diluer la protéine. La micropipette est immergée dans une goutte de ce même tampon pour éviter que l'extrémité ne sèche. La poignée est alors retirée de la goutte d'eau et disposée de telle manière à ce que l'axe formé par la bille de polystyrène et le point de colle soit dans le plan focal, parallèle à la micropipette. La micropipette est alors retirée du tampon et placée en regard de la bille. Sous un objectif 100X, on vient appliquer l'extrémité de la micropipette sur la poignée de telle manière à ce que seule la bille soit immergée dans la solution comme illustré sur la figure II.17. On voit maintenant l'avantage de la bille de colle qui permet d'avoir un espacement entre le bout de la micropipette et la fibre afin de ne pas mouiller la fibre avec la solution d'activateur. Par une suite de très légères surpressions, on vérifie que la bille est bien disposée au centre de la micropipette : un ménisque défléchit la bille qui sort puis rentre dans la micropipette. On laisse la bille immergée 10 minutes pour laisser l'adsorption se réaliser. L'ensemble est ensuite recouvert par le dépôt d'une goutte de 200 μl d'une solution de BSA 1% dans du tampon X pour saturer les parties non recouvertes de la poignée. La micropipette est alors retirée. La poignée reste immergée dans cette solution jusqu'à ce qu'on la retire pour faire une expérience. L'opération de coating est la plus délicate de toute l'expérience. La micromanipulation consistant à insérer la bille dans la micropipette est difficile sachant qu'il ne faut pas que la fibre soit en contact avec la protéine sans quoi de l'actine sera polymérisée hors de la bille. Par ailleurs, lors de l'incubation de 10mn à l'air, la surface du liquide a tendance à sécher ce qui fixe la bille dans la pipette. Lorsque l'on place une goutte sur les objets, les forces capillaires agissant sur la fibre induisent un déplacement relatif par rapport à la micropipette et donc une contrainte sur le point de colle puisque la bille est bloquée. Il arrive alors très souvent que la poignée vienne se casser au point de colle.

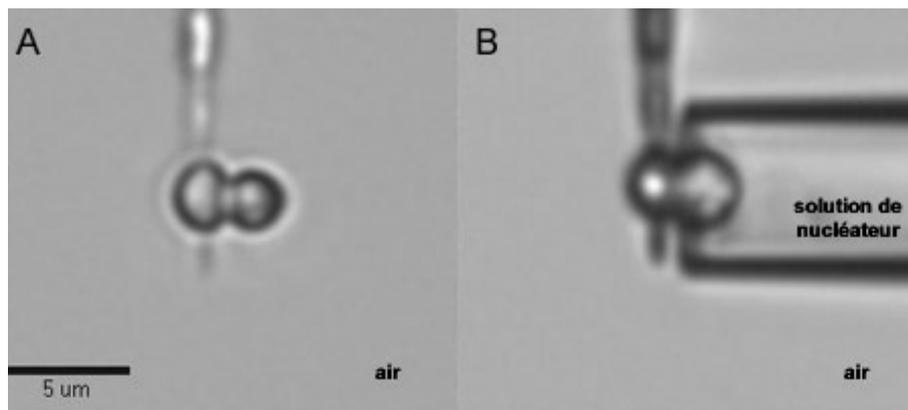


Fig. II.17 Coating d'une poignée. A : poignée dans l'air. B : poignées immergées dans la micropipette remplie d'activateur

II.4 Conditions et mise en place

II.4.1 Conditions Biochimiques

L'expérience présentée dans cette étude nécessite des conditions particulières de croissance des comètes. Les conditions requises sont :

- une densité de comète suffisante et une faible dépolymérisation pour permettre l'attachement
- une vitesse de croissance telle que la comète soit visible sur les images. L'idéal est d'observer une croissance assez rapide pour que la comète s'allonge de plusieurs microns tout en restant dans le champ de la caméra pendant une mesure de 10 à 20mn.

Il est donc extrêmement important d'avoir la possibilité d'ajuster ces paramètres. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur le milieu de protéines purifiées plutôt que sur les extraits cellulaires car il permet cet ajustement. Par ailleurs, ce système est beaucoup plus reproductible que les extraits ce qui est toujours appréciable.

II.4.1.a Choix de la protéine activatrice

N'importe quelle protéine activatrice d'Arp2/3 peut être placée dans la micropipette de coating pour recouvrir les billes des poignées. VCA a été utilisée au début de cette étude comme protéine activatrice puisqu'elle a servi au laboratoire pour faire la plupart des études sur le système biomimétique (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002). Toutefois, le choix

de l'activateur s'est ensuite porté sur la protéine N-WASp. Cette protéine étant l'activateur utilisée au laboratoire de Marie-France Carlier, la polymérisation d'actine sur des billes recouvertes de NWASP y a été étudiée de manière extensive notamment en terme d'adsorption et d'activation du complexe Arp2/3 (Wiesner, Helfer et al. 2003). Le choix de la concentration de NWASP est discuté plus loin car il dépend des autres concentrations en protéines.

II.4.1.b Choix des concentrations du milieu et de l'activateur

Nous nous sommes fondés sur les concentrations en protéines mises au point par l'équipe de Marie-France Carlier (Wiesner, Boujemaa-Paterski et al. 2002). Nous les avons ensuite optimisées pour régler la vitesse de croissance, la densité de la comète et la dépolymérisation. Les protéines susceptibles de modifier la vitesse de manière significative par une variation de leur concentration sont la N-WASp, la gelsoline et l'ADF. Tandis que les deux premières changent la densité du gel, l'ADF a l'avantage de peu la modifier puisqu'elle agit sur la quantité d'actine G disponible pour la polymérisation. Il est donc pratique de régler la concentration de N-WASp pour ajuster la densité et de modifier ensuite l'ADF pour ajuster la vitesse finale, la concentration de gelsoline restant fixée. Il ne faut pas que la concentration de N-WASp soit trop élevée non plus pour ne pas engendrer des comètes multiples. Il est alors toujours possible d'ajuster la concentration en gelsoline pour les faire disparaître (Wiesner 2003) mais cela implique la variation d'un troisième paramètre qui joue à la fois sur la vitesse et la densité ce qui complique la mise au point des concentrations finales. Le tableau montre comment ont été modifiées les concentrations standards de motilité de bille pour aboutir au jeu utilisé dans cette étude.

		Wiesner et coll. $\langle V \rangle = 1.5 \mu\text{m}/\text{min}$	Sur les poignées $\langle V \rangle = 1,5-3 \mu\text{m}/\text{min}$
coating	NWASP (μM dans la solution d'incubation)	0,3-0,4	0,75
Milieu	Arp2/3	0,1	0,1
	Gel Soline	0,1	0,1
	ADF	3,5-5,5	4,2
	Profiline	2,4	2,4
	F-Actine	7	7,2

II.4.1.c Protocole

La composition du milieu (mis à part la modification des concentrations en protéines) est détaillée par Wiesner et coll. (Wiesner, Boujemaa-Paterski et al. 2002). L'ensemble des produits après décongélation est conservé sur glace. Avant de faire le mélange final, il faut préparer l'actine F et le mix (composé d'ATP, d'anti photo blanchiment et d'un agent réducteur) avec le protocole suivant.

Actine F

- A $30 \mu\text{l}$ de G-actine, on ajoute un équivalent molaire $+10 \mu\text{M}$ de MgCl_2 et $200 \mu\text{M}$ d'EGTA. On laisse l'échange d'ions s'effectuer 2 à 3 minutes sur glace.
- On ajoute ensuite 1mM final de MgCl_2 et $0,1 \text{M}$ final de KCL et on laisse polymériser à température ambiante pendant 15 minutes.

Mix

- A partir d'une solution mère de 0,2M d'ATP dans l'eau, on prépare une solution contenant 30mM d'ATP et 60mM de MgCl₂.
- On dilue du Dabco 22mM dans l'eau pour obtenir une solution à 2.2mM
- Le mix se compose enfin de un volume d'ATP/Mg, un volume de Dabco 2,2mM et un demi volume de DTT 0,2M.

Le milieu est finalement préparé en ajoutant les composés dans l'ordre suivant :

Arp2/3	0,1μM
gelsoline	0,1μM
ADF	4,2μM
profiline	2.4μM
Mix	4.5μl
BSA 1%	Compléter à 30μl
actine F	7,2μM

II.4.2 La cellule d'expérience

Les expériences de manipulation de comète s'effectuent dans une cellule. Elle contient environ 25μl de milieu de protéines et doit permettre à la fois la pénétration des fibres et des micropipettes tout en limitant l'évaporation de la solution. Ce cahier des charges est satisfait par la combinaison de PDMS réticulé et de PDMS liquide qui vient recouvrir la cellule. La partie solide de la cellule est fabriquée à partir d'un rectangle (20x15x1mm) surmonté d'un petit muret réalisé en moulant du PDMS mélangé à un agent réticulant (Sylgard 184, Corning) dans un moule de plexiglass. On vient ensuite coller le rectangle sur une lamelle (40*50mm). On creuse ensuite deux canaux se rejoignant perpendiculairement pour permettre d'immerger micropipette et fibre. Enfin on vient coller sur l'intersection des canaux une lamelle de verre découpée (5x5mm) qui assure une interface plane nécessaire à l'imagerie. Une fois la cellule remplie de la solution et les objets en place, l'ensemble immergé est recouvert de PDMS liquide (500cst) pour empêcher l'évaporation.

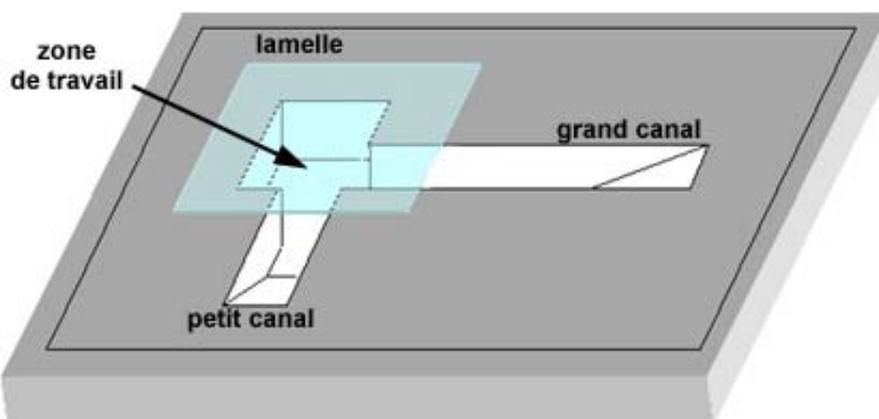


Fig. II.18 cellule en PDMS

II.4.3 Protocole

Les poignées flexibles sont préalablement fabriquées, calibrées et référencées. Pour chacune d'entre elles, on dispose d'une image et de la valeur de leur raideur. Avant chaque expérience, on en choisit une suivant sa raideur en fonction de l'amplitude des forces à appliquer et on fabrique une cellule. On peut alors passer à la préparation de l'expérience dont le protocole est le suivant :

- les micropipettes de coating et d'attachement de comètes sont forgées en double et repérées par une marque de couleur.
- Le dispositif hydraulique est nettoyé à l'éthanol, rincé à l'eau puis rempli de tampon X à 4°C.
- On nettoie à l'éthanol une lamelle (24*50mm) que l'on place sur le microscope et autour de laquelle on dispose du papier imbibé d'eau pour créer une atmosphère humide.
- On dispose sur la lamelle une goutte d'eau MilliQ et une goutte de tampon X (50µl chacune)
- La poignée choisie est fixée dans son porte fibre lui-même vissé sur le micromanipulateur de fibre et plongée dans la goutte d'eau MilliQ.
- La protéine N-WASp fraîchement décongelée est diluée dans du tampon X pour obtenir une concentration de 0,75µM dans un volume final de 35 à 50µl.

- A l'aide d'un Microfill (capillaire solidaire d'une seringue), une micropipette de coating est remplie de la solution de N-WASp en évitant la présence de bulles d'air.
- Elle est ensuite insérée dans le porte micropipette relié au dispositif hydraulique. Le porte micropipette est fixé au deuxième micromanipulateur et la micropipette est plongée dans la goutte de tampon X.
- Les deux objets sont sortis de leur goutte respective puis le coating est réalisé comme expliqué en I.3.3.
- Après les 10 minutes d'adsorption, une image de coating est prise puis les objets sont recouverts d'une goutte (~100µl) de solution de BSA 1% dans du tampon X, la micropipette est retirée et la fibre est laissée 5 minutes dans cette solution (voir toujours I.3.3).
- Pendant ce temps, le milieu est préparé. A la fin de l'incubation avec la BSA, la cellule est remplie de milieu avec un cône très fin pour rentrer sous la lamelle. Cette opération s'effectue sous une loupe binoculaire pour contrôler qu'il n'y a pas de petites bulles d'air dans la cellule. Le cas échéant, elles sont retirées avec un cône sec.
- La cellule remplie est placée sur la platine de microscope contre la lamelle qui a servi au coating.
- La poignée flexible est retirée de la goutte de BSA, la cellule glissée sous la poignée et la poignée est enfin immergée dans le grand canal de la cellule. Cette opération pendant laquelle la bille est à l'air (dans une atmosphère humide) doit être la plus rapide possible. Elle dure en général moins de 30 secondes. Une fois immergée, la bille est placée au centre de la zone de travail.
- A l'aide du Microfill qui a été rincé, une micropipette d'attachement est remplie de tampon X. Elle est ensuite immergée dans le petit canal puis placée dans la zone de travail à côté de la poignée.
- L'ensemble est ensuite recouvert de 100 µl de PDMS liquide qui vient remplir la « piscine » délimitée par les murets sur les bords de la cellule.

L'ensemble se stabilise en quelques dizaines de minutes (le temps que tout se thermalise et que le PDMS ait fini de tout recouvrir). L'expérience elle-même peut alors commencer.

- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, et al. (2002). "The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters." *Nature* **417**(6886): 308-11.
- Chaikin, P. M. and T. C. Lubensky (1997). *Principles of condensed matter physics*. Cambridge, University Press.
- Cluzel, P., A. Lebrun, et al. (1996). "DNA: an extensible molecule." *Science* **271**(5250): 792-4.
- Howard, J. and A. J. Hudspeth (1987). "Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechano-electrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 3064-8.
- Merkel, R., P. Nassoy, et al. (1999). "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy." *Nature* **397**(6714): 50-3.
- Wiesner, S. (2003). Mécanisme moléculaire de la motilité cellulaire basée sur la polymérisation d'actine. Faculté des Sciences. Orsay, Paris XI.
- Wiesner, S., R. Boujemaa-Paterski, et al., Eds. (2002). *Actin based motility of *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri**. Methods in microbiology, Academic Press.
- Wiesner, S., E. Helfer, et al. (2003). "A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility." *J Cell Biol* **160**(3): 387-98.

III. Résultats

Nous disposons maintenant des outils qui permettent de micromanipuler le système biomimétique. En effet, une comète se développe à partir d'une poignée flexible reproduisant toutes les caractéristiques des billes libres. Cette comète est attachée à une micropipette que l'on peut déplacer. Nous exerçons des forces, mesurées et contrôlées grâce à la flexibilité des poignées, qui peuvent aller jusqu'à l'arrachement de la comète. Nous avons alors la capacité de réaliser une gamme d'expériences variées pour sonder les propriétés physiques aussi bien statiques que dynamiques de la propulsion par polymérisation d'actine. Pour ce faire, trois types de sollicitations ont été imposées :

- Croissance contre un obstacle flexible : la micropipette est fixe et on suit simplement le mouvement de la bille contre la charge.
- Force imposée : la force est imposée et maintenue constante grâce à une rétroaction. Ce type d'expérience permet d'obtenir chaque point d'un diagramme force vitesse du système.
- Vitesse imposée : la micropipette est déplacée à vitesse constante pour imposer une vitesse au système. Ce type de sollicitation nous a conduit à :
 - caractériser les propriétés physiques du système dans le cas des grandes vitesses
 - mettre en évidence une transition vers une instabilité dynamique pour des vitesses plus faibles.

III.1 Croissance d'une comète sur une poignée

La bille collée sur la fibre flexible développe une comète au bout de quelques minutes dans le milieu de protéines. Cette comète peut pousser des heures durant (jusqu'à 15h observés). Toutes les expériences sont réalisées en observant avec un objectif à contraste de phase 60X auquel est ajouté un grossissement de 1.5 (« tirette » du microscope). Nous utilisons un objectif à air afin d'éviter toute perturbation lors de la focalisation et surtout car il a grande distance de travail. Les images sont prises à l'aide d'une caméra CCD refroidie (Coolsnap, Princeton Instruments) pilotée par le logiciel Metamorph.

III.1.1 Génération d'un comète

Contrairement aux billes libres qui doivent briser la symétrie (étapes de quelques minutes dépendante du diamètre (Bernheim-Groswasser, Wiesner et al. 2002)) une comète est générée quasiment instantanément car l'objet (la bille) est déjà asymétrique. Ce temps de formation est un indicateur du succès de l'étape de coating. En effet, si du N-WASp a été adsorbé ailleurs que sur la bille (sur la bille de colle ou sur la fibre) un gel croit tout autour de la poignée. Bien qu'il y ait une excroissance au niveau de la bille, il n'y a pas alors formation d'une comète à proprement parler. Par contre, il est intéressant de noter que le gel croit plus vite aux endroits de plus forte courbure, ce qui est en accord qualitatif avec l'analyse élastique. La figure III.1 illustre ce propos. Il s'agit d'une expérience préliminaire pendant laquelle on avait plongé toute la poignée dans une solution de VCA. Une queue d'actine se développe à partir de la bille bien que le gel pousse partout ailleurs. Lorsque l'activateur ne se situe que sur la bille, le temps que met le gel à former une comète d'une longueur de l'ordre de la taille de la bille dépend de la surface couverte par l'activateur. Lorsque quasiment toute la surface libre de la bille est recouverte, une épaisseur de forte densité se forme à sa surface avant d'engendrer une comète. Durant cette période, le front de gel se déplace moins vite que lorsque la comète est pleinement formée. Par contre, si la surface recouverte est plus faible (inférieure à la moitié de la surface totale de la bille), la comète se forme quasiment instantanément, comme c'est le cas lors de l'utilisation de billes asymétriques (Cameron, Footer et al. 1999). Nous n'avons pas procédé à une étude systématique de ces phénomènes car premièrement, la surface de coating est difficile à mesurer et deuxièmement, nous avons concentré nos efforts sur les manipulation de comète qui nécessitent des opérations qui s'effectuent durant la période de génération.

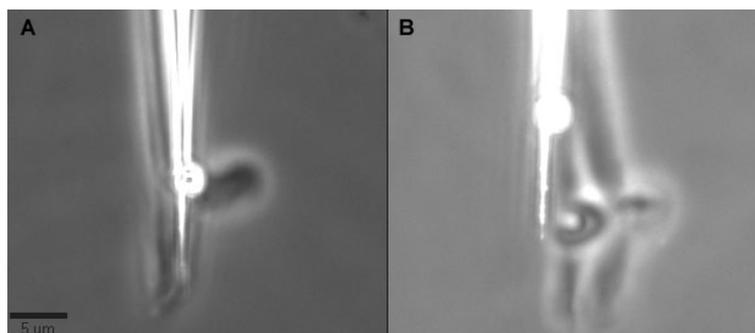


Figure III.1 polymérisation sur tout l'objet. A une queue d'actine s'est formée. B après détachement on peut observer une gaine de gel qui entoure toute la poignée

III.1.2 Géométrie

Les comètes sont identiques à celles de billes libres placées dans le même milieu à quelques détails près. Le diamètre des comètes est parfois plus faible et elles sont souvent courbées. En effet, c'est la manière dont l'activateur est distribué sur la surface qui va déterminer la forme des comètes (à concentrations de protéines fixées). En particulier, la profondeur d'immersion de la bille dans la micropipette de coating est déterminante. Plus la bille est immergée dans la solution de N-WASp, plus la surface recouverte est grande et plus large sera la comète. A priori, l'idéal est de recouvrir au maximum la bille pour se rapprocher de la situation des billes libres en solution. Toutefois, le risque de recouvrir d'autre partie de la poignée est d'autant plus grand. Si c'est le cas, du gel pousse en dehors de la bille ce qui rend la poignée inutilisable. Ainsi, il arrive qu'on prenne une « distance de sécurité » et que l'on recouvre un peu moins la bille. Les images de la figure III.2 illustrent cet aspect. On voit la différence de diamètre suivant le recouvrement de la solution d'activateur sur la bille. La courbure de la comète vient de la disposition des objets lors du coating. En effet, la micropipette a parfois un angle par rapport à la poignée (si la bille n'est pas collée exactement perpendiculairement à la fibre ou si la fibre est défléchie pendant le coating) et la surface recouverte ne sera pas symétrique, ce qui engendre une courbure de la comète.

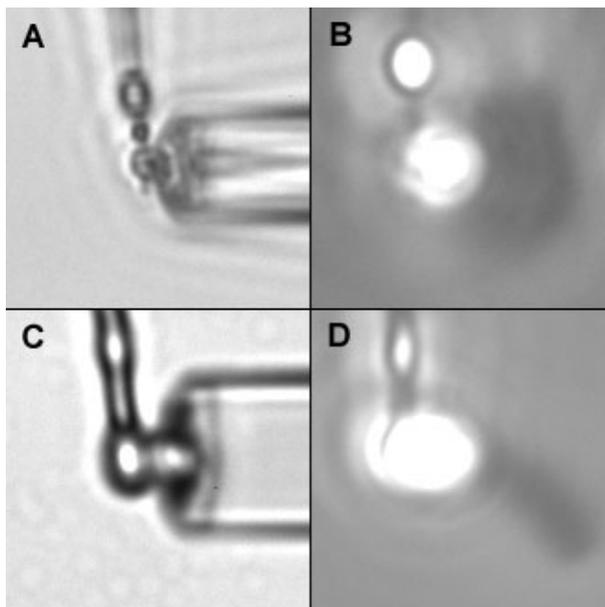


Fig. III.2: relation entre immersion et diamètre de comète. En A et C sont représentés les coating et B et D, les comètes respectives.

III.1.3 Vitesse

Il est extrêmement difficile de mesurer la vitesse de croissance des comètes qui poussent sur les poignées car celles-ci restent rarement dans le plan focal du microscope. Lorsque c'est le cas, on peut mesurer des vitesses comparables à celle de billes libres placées dans le milieu (quelques $\mu\text{m}/\text{min}$). Bien qu'il n'ait pas été possible de faire de statistique, elles semblent toutefois plus faibles. A priori, la vitesse de croissance n'a pas de raison d'être égale à la vitesse de la bille si elle n'était pas fixée à la poignée étant donné que l'équilibre des forces est différent. En effet, dans le cas d'une bille libre, ce sont les forces visqueuses appliquées respectivement sur la bille et la comète qui gouvernent cet équilibre. Dès que la taille de la comète dépasse celle de la bille, la force appliquée à la comète est supérieure et c'est la bille qui se déplace, la comète restant quasiment fixe. Dans le cas des poignées flexibles, la situation est différente puisque la bille est immobile et la comète se déplace. On remarque d'autre part que les vitesses de croissance sont variables en fonction de la surface recouverte d'activateur. Les comètes plus fines poussent plus vite que celles plus épaisses comme dans l'exemple de la figure III.3. Ceci est à rapprocher des observations faites sur les billes asymétriques dont la moitié de la surface n'est pas recouverte de protéine qui ont une vitesse supérieure à celle de billes entièrement recouvertes (Cameron, Footer et al. 1999).

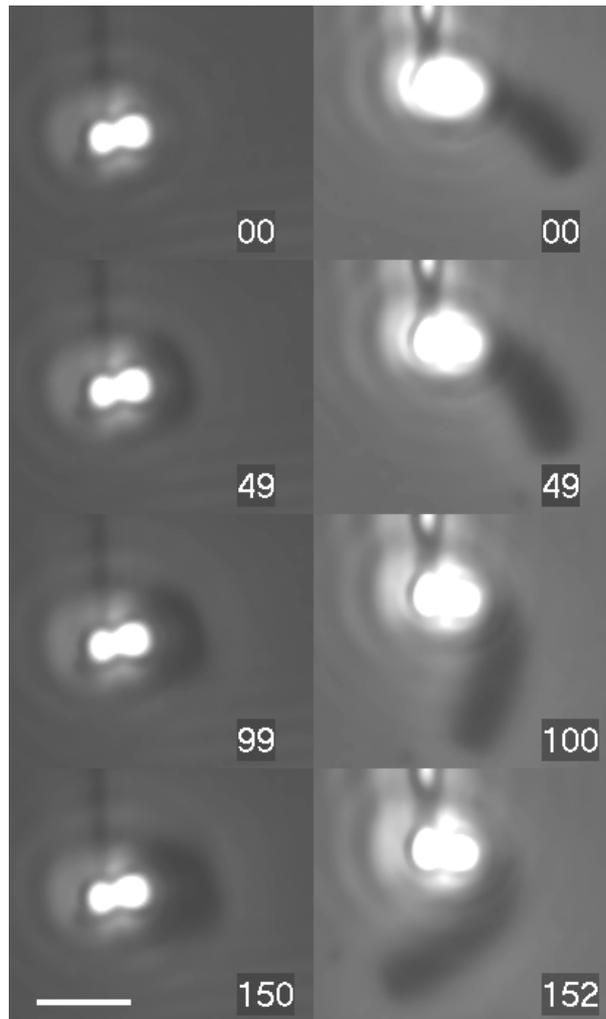


Fig. III.3 Séquence de croissance pour deux poignées dont la surface couverte diffère. Les temps représentés en bas à droite sont en secondes (barre de calibration 5 μ m)

III.2 Application d'une force

III.2.1 Attachement de la comète

La comète est maintenue par une micropipette en exerçant une succion du gel de manière similaire à l'attachement de chromosomes par Houchmandzadeh et coll. (Houchmandzadeh, Marko et al. 1997). La micropipette est placée en face de l'extrémité de la comète. Elle est ensuite amenée au contact avec la comète en ajustant l'alignement avec le piézo analogique et en s'approchant avec le piézo numérique. Il est très difficile d'évaluer la position exacte du contour de la comète. Aussi le moment où le contact est réalisé est détecté par une petite déflexion de la bille. Notons que si la fibre est trop rigide, cette déflexion sera difficile à observer. On vient alors appliquer une légère différence de pression dans la micropipette en

déplaçant le piston de la seringue grâce à une vis micrométrique. La comète est aspirée et vient bloquer l'ouverture de la micropipette. Si le contact n'était pas bien fait, on observe un mouvement rapide de la comète qui se stabilise ensuite lorsqu'elle est bloquée. On voit maintenant l'utilité de la géométrie des micropipettes. Elles présentent une surface dont le diamètre doit être supérieur à celui de la comète pour la caler mais une ouverture de succion petite que la comète pour éviter d'aspirer la comète. Cette géométrie permet également d'éviter le déchirement de la comète qui subirait un cisaillement si l'extrémité de la pipette était plus petite que la comète. La dépression est ensuite légèrement augmentée pour être sûr de la stabilité de l'attachement. Il est impossible de connaître l'état du gel proche de la micropipette. Toutefois, on peut observer que dans la plupart des cas, la connexion n'est pas complètement étanche (des objets passant à proximité sont aspirés après attachement). Cet attachement est donc transitoire mais le temps de relaxation est largement supérieur aux durées des expériences (maximum 20 minutes). De plus, il est suffisamment robuste pour supporter des forces de plusieurs nanonewtons comme on le verra par la suite. La densité du gel joue évidemment un rôle important dans ce processus. Si le gel n'est pas assez dense, l'attachement est impossible car il n'y a pas de saut de pression à la traversée de l'ouverture. C'est la raison pour laquelle la concentration de N-WASp a été ajustée pour produire une comète assez dense pour permettre un bon maintien.

III.2.2 Application et mesure d'une force

Une force peut maintenant être appliquée en déplaçant la micropipette à l'aide du déplacement piézoélectrique numérique. A tout instant, le système est en équilibre. Les effets inertiels sont négligeables étant donné que le nombre de Reynolds est extrêmement faible à ces échelles. Si on écrit l'équilibre des forces appliquées au système {bille-comète}, la force appliquée par la pipette est équilibrée par la force élastique de la fibre défléchie. Si maintenant on s'intéresse à la bille, la force exercée par la fibre sur la bille est égale à la force exercée par la comète sur la bille (notée F_{int} sur la figure III.4). Si il n'y avait pas de polymérisation d'actine ni de glissement du gel, cette force serait uniquement la force élastique exercée par la comète en tant que milieu déformable sous contrainte.

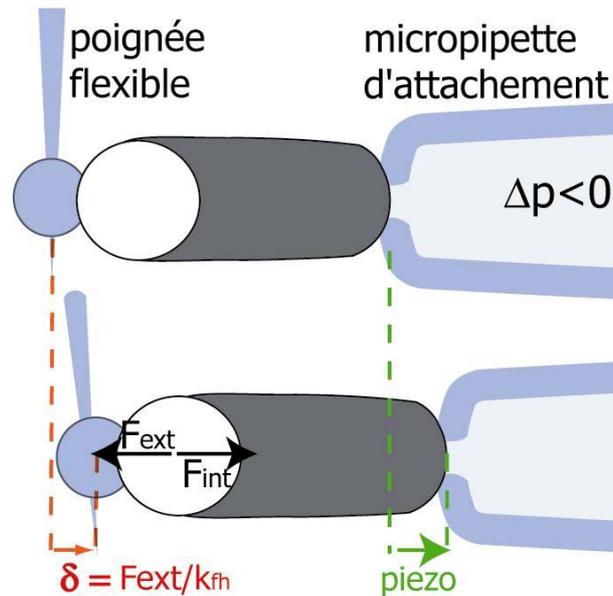


Fig. III.4 Application d'une force par déplacement de la micropipette.

La force exercée par la fibre est le produit de la raideur par sa déflexion. Cette déflexion est mesurée par traitement d'image en comparant l'image correspondante à un instant donné à une image de référence prise avant l'attachement. Pour effectuer cette mesure, on utilise la fonction *Track Objects* du logiciel Metamorph, dont le principe est illustré en figure III.5. Sur l'*image de référence*, on sélectionne une zone rectangulaire qui entoure l'objet à suivre et forme l'*image objet*. La position du centre de la zone définit la position initiale (pixel rouge). Autour de cette zone est délimité un deuxième cadre plus grand qui définit la *zone de recherche* (A). C'est dans cette zone que le programme va rechercher l'objet dans la nouvelle image (B). Pour cela, il effectue le produit de convolution de l'*image objet* avec l'image contenue dans la *zone de recherche* (un peu comme lorsque l'on a décalqué un contour et que l'on cherche à faire coïncider de nouveau le calque sur le contour). Le résultat est une matrice (C) dont la valeur maximale donne la nouvelle position de l'objet(D). La distance entre les objets donne la déflexion et donc la force.

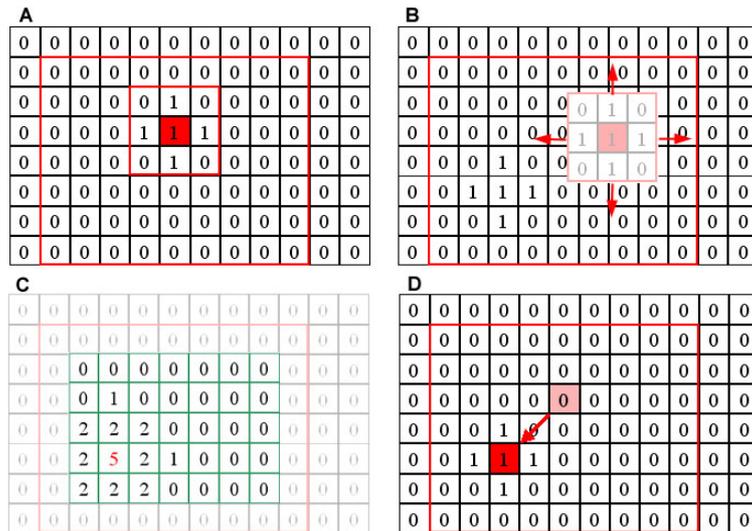


Fig. III.5 illustration du tracking avec un objet croix. A : *image de référence* (temps t) dans laquelle est délimité *l'image objet* (petit cadre rouge) et la *zone de recherche* (grand cadre rouge). B : La nouvelle image (temps t+1) parcourue par *l'image objet* (en transparent) objet. C : matrice des résultats du produit de convolution (en vert). D : nouvelle position de l'objet.

Les opérations réalisées sont en fait plus complexes que la figure et la résolution est plus fine que le pixel (dont la taille correspond à 0.078 microns). Au cours des mesures de force, seule l'abscisse (le long de l'axe bille-micropipette) de la position de la bille est utilisée ce qui permet de réduire d'éventuelle erreurs dues au décalage de l'image le long de l'ordonnée. On fait ainsi une erreur relative $1 - \frac{\sin \alpha}{\alpha}$ où α est l'angle que fait la fibre avec sa position initiale.

Cet angle n'est jamais supérieur à 15° et l'erreur introduite est donc inférieure à 1%.

III.2.3 Automatisation des expériences.

L'automatisation permet non seulement de standardiser les expériences mais aussi de contrôler la valeur de la force en temps réel. Nous avons utilisé une rétroaction pour imposer une force : la déflexion (donc la force) est corrigée en déplaçant la micropipette. L'automatisation s'articule autour de la fonction *Track Objects* de Metamorph. Elle est réalisée grâce à l'insertion de programmes appelés *journaux* entre chaque *track* qui réalisent la prise d'une nouvelle image, effectuent les calculs et envoient des ordres au piézo numérique. Tous les protocoles présentent une architecture commune. Avant l'attachement, on procède à une étape d'initialisation. L'ensemble des paramètres qui sont spécifiques à

chaque protocole y est défini (comme la force à appliquer, la vitesse de tirage...). Une image de référence est ensuite acquise (Fig.III.6 A). Dans cette image de référence, on dessine une zone qui entoure la bille et qui définit les pixels qui vont constituer l'image de mesure que traite la fonction *Track Objects* (contour bleu dans A). En effet, le *tracking* étant une opération coûteuse en temps de calcul, les images utilisées sont de taille réduite (entre 100*60 et 350*100 pixels). La taille de cette image est déterminée par la rigidité de la fibre et par le protocole à suivre : pour que la bille soit toujours sur l'image, il faut avoir une idée du maximum de force et donc de la déflexion maximale au cours de l'expérience. Une fois l'attachement effectué, on appelle la fonction *Track Objects* et on sélectionne les zones d'objet et de recherche dans l'image de mesure initiale (rectangles verts dans B) puis on lance cette fonction. Entre chaque *track*, l'ordre à donner au piézo est calculé en fonction de la position mesurée (ou de l'intervalle de temps) puis envoyé. Une nouvelle image de mesure est prise (C,D,E) puis un nouveau pas est effectué. Le parcours du centre de l'objet est dessiné en vert. Tous les 10 à 30 pas, une image pleine est acquise pour visualiser la comète. On peut ainsi effectuer une mesure tous les 0,4 secondes environ sauf lorsque l'on prend une image pleine où il faut environ une seconde. On a alors l'avantage de pouvoir visualiser la comète en croissance.

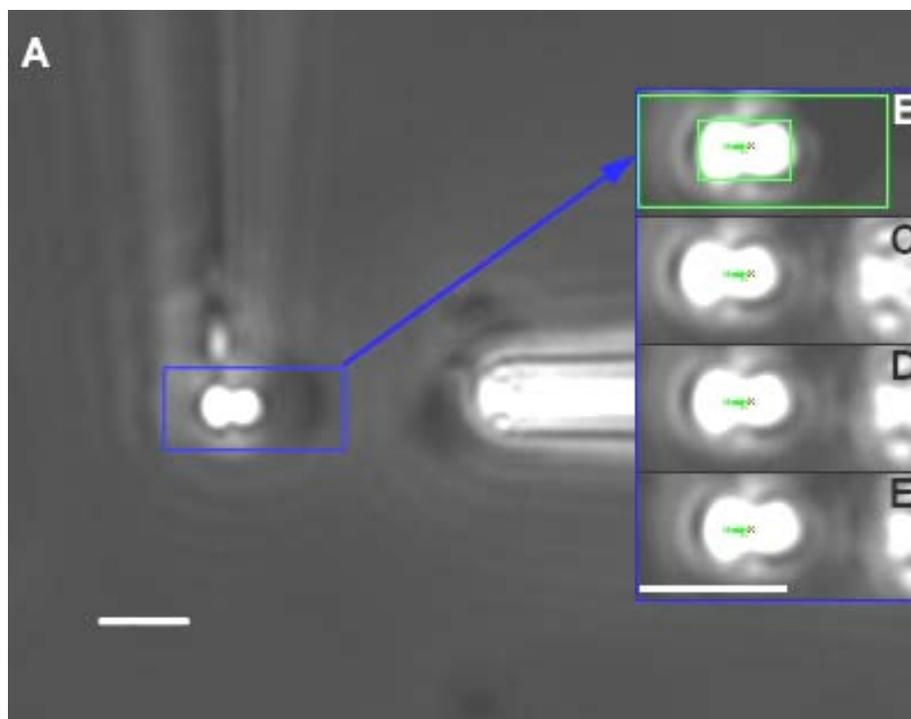


Fig. III.6 Initialisation et tracking. A : image de référence : le cadre bleu délimite la zone sur laquelle vont être prises les images de tracking. B : image de tracking avant attachement. Elle sert à fixer le zéro de la déflexion C,D,E images de tracking suivantes (tous les 5 pas). Les deux barres de calibration font 5 microns.

III.3 Caractérisation physique du système. Propriétés statiques

Les propriétés statiques de la comète sont mises en évidence en déplaçant la pipette à une vitesse constante grande devant la vitesse de croissance. Elle est effectuée dès l'attachement ou bien à la fin d'une expérience à force constante.

III.3.1 Séquence d'évènements du tirage rapide

La vitesse de tirage V est de $10\mu\text{m}/\text{min}$ ce qui est 3 à 5 fois plus rapide que la vitesse de croissance sans force ($2\mu\text{m}/\text{min}$). Ce tirage rapide est réalisé grâce au protocole d'automatisation suivant (cas du tirage dès attachement). Après la procédure d'initialisation qui définit l'ensemble des paramètres de l'expérience (vitesse, fréquence d'échantillonnage...), le tracking est lancé. Il fournit la position de la bille qui est enregistrée ainsi que l'intervalle de temps entre chaque mesure. La position du piézo de la micropipette p est incrémentée en lui retranchant le pas calculé en multipliant l'intervalle de temps par la vitesse de tirage : $p=p_0-V\Delta t$. Une nouvelle image de mesure est ensuite acquise. Toutes les 10 à 30 mesures, une image pleine est enregistré (ceci ralentit la boucle, mais ne change pas la vitesse absolue puisque la position est calculée grâce à l'intervalle de temps entre les mesures). Si le tirage rapide est effectué à la suite d'une expérience à force constante, le zéro repéré lors de l'expérience préliminaire est utilisé et le reste est inchangé. Une expérience typique de tirage rapide est représentée en figure III.7. ΔL est l'accroissement de la distance entre la bille et la micropipette soit $\Delta L = p_0 - p - \delta$ où δ est la déflexion de la bille. La courbe de force en fonction du temps se décompose en trois phases. Une première phase où la comète subit une extension quasi linéaire. Durant cette phase, la grandeur ΔL est égale à l'allongement de la comète. La comète résiste à la force appliquée comme cela est montré sur la figure II.7.d. Un régime non linéaire lui succède durant lequel l'augmentation de la force est moins rapide tandis que la montée de ΔL s'accélère. La force atteint ensuite un maximum (2.8nN dans cet exemple). Ce régime se termine par le détachement de la comète visible sur l'image (E) ainsi que par la chute de la force sur la courbe (A). Enfin, après détachement, une nouvelle comète repousse (F). L'accident de la courbe vers 13s est dû à la prise d'image qui dure 1s. Pendant ce laps de temps, la comète a le temps de croître et la force relaxe un peu.

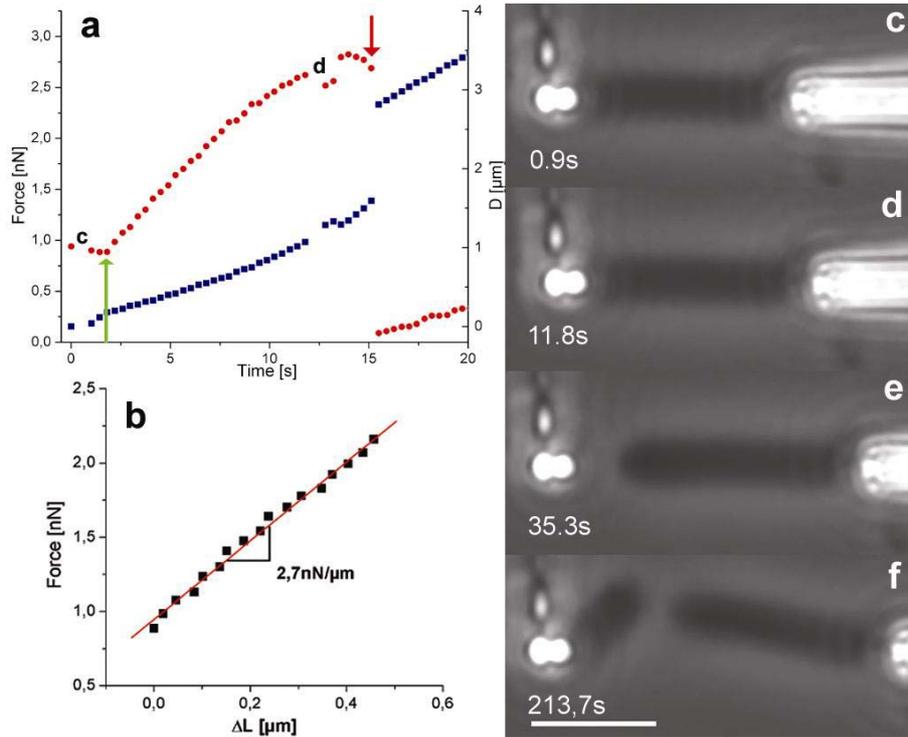


Fig. III.7 Tirage rapide. A : Force (rouge) et Distance ΔL (bleu) en fonction du temps. Le tirage commence à partir de la flèche verte. B : Force en fonction de la distance ΔL et ajustement linéaire (rouge). C,F séquence d'images des évènements. Le temps en seconde est indiqué sur les images. Barre de calibration $10\mu\text{m}$

III.3.2 Régime « élastique » : estimation du module d'Young

La partie linéaire de la courbe force-extension $F(\Delta L)$ aux temps courts va nous permettre d'estimer le module d'Young de la comète. On suppose que durant ce régime, la croissance de la comète est négligeable. On peut alors dire que ΔL est égal à l'extension élastique de la comète due à la force externe. La pente de la courbe de la figure III.7b est donc la rigidité de la comète k_c et vaut dans cet exemple $2.7\text{nN}/\mu\text{m}$. On en déduit le module d'Young en assimilant la comète à un cylindre élastique et en écrivant que $\frac{\Delta l_e}{l_c} = \frac{F}{S_c E}$, où l_c est la

longueur à vide de la comète, S_c sa section et E son module d'Young. On a donc $E = k_c \frac{l_c}{S_c}$.

Les grandeurs géométriques l_c et S_c sont mesurées par traitement d'image comme cela est illustré sur la figure III.8. Le profil d'intensité moyenné sur une largeur de $0.5\mu\text{m}$ est tracé en fonction de la distance. On calcule ensuite la dérivée de cette fonction. Le diamètre de la comète est égal à la distance entre les extrémaux de la dérivée. Dans le cas des figure III.6, on trouve une section de comète $S_c=9.6\mu\text{m}^2$ et une longueur à vide de $l_c=19.5\mu\text{m}$ ce qui donne

un module d'Young $E=5600$ Pa. A la suite de 10 expériences similaires, on trouve une valeur moyenne du module d'Young de 3700Pa avec des valeurs qui s'étalent de 700 à 7000Pa.

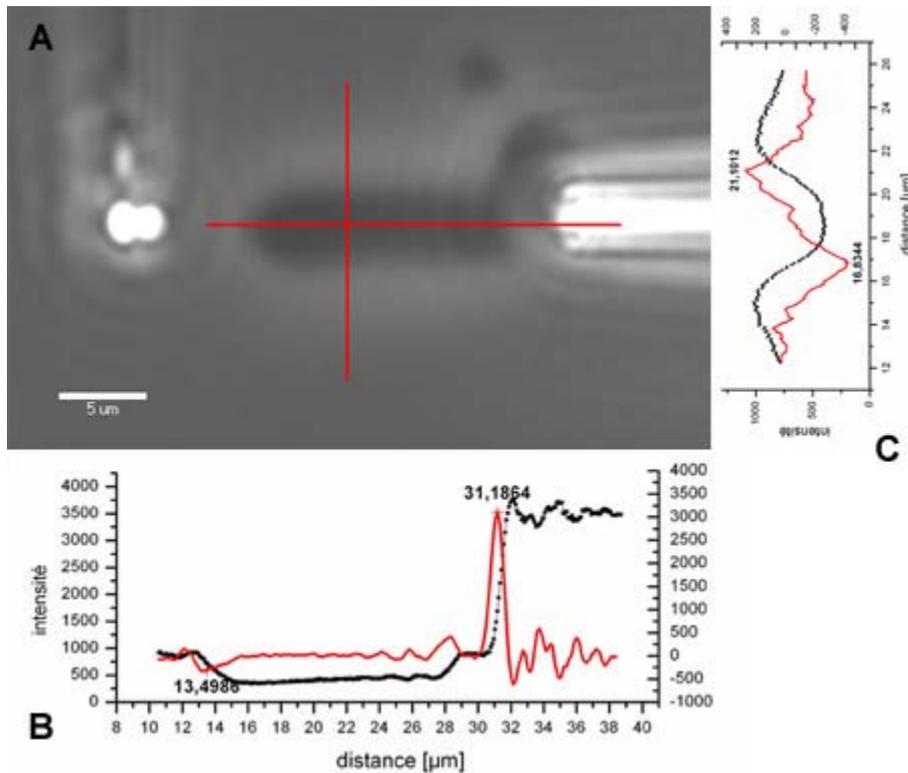


Fig. III.8 Mesures géométriques sur la comète(A).. B : mesure de la longueur. C : diamètre de la comète Les courbes noires représentent les profils d'intensité et les courbes rouges leur dérivées respectives.

La valeur trouvée est comparable avec les mesures effectuées sur *Listeria* qui s'étendent de 10^3 à 10^4 Pa (Gerbal, Laurent et al. 2000). Par contre il est étonnant de trouver un étalement aussi important pour le système de protéines purifiées beaucoup plus reproductible que les écarts statistiques observés dans une population de bactéries. Deux raisons permettent d'expliquer cet aspect. Premièrement, la croissance de la comète pendant le tirage est une première source d'erreur. En la négligeant, on sous-estime le module d'Young puisque l'extension que l'on mesure est plus grande que la pure extension élastique. Deuxièmement, le tirage rapide est le type de sollicitation le plus défavorable pour l'attachement de la comète à la micropipette. La force et la vitesse appliquées sont importantes et sollicitent fortement la connexion entre la micropipette et le gel. Il peut arriver par exemple que le gel glisse le long de la micropipette si celui-ci n'est pas attaché par son extrémité (comme sur la figure III.8) ce qui ajoute une erreur au calcul de l'extension et produit une dispersion des données.

III.3.3 Arrachement de la comète- Force de l'interaction

Dans tous les cas observés, la rupture s'effectue toujours à la surface de la bille. D'autre part, on n'observe pas de gel restant sur la surface (du moins à la résolution optique près). On est alors dans le cas d'une rupture adhésive. La forme de la courbe obtenue est assez similaire aux courbes obtenues par des mesures d'adhésion sur pégosimètre. Par ailleurs, le fait qu'une comète repousse montre que les protéines activatrices à la surface sont préservées lors de cet évènement. On peut donc supposer que la chute de la force correspond à une cassure au niveau des liaisons entre les protéines activatrices et les filaments d'actine. La force maximale avant la rupture est donc la force d'adhésion entre le gel et les molécules de N-WASp adsorbées. Il s'agit de la force de la liaison N-WASp-actine fois le nombre de liaisons pour le taux de charge considéré. Elle dépend bien sûr de la vitesse à laquelle on tire. Dans l'exemple de la figure III.6 cette force est égale à 2.8nN. La valeur moyenne issue de 11 expériences similaires est $3.0 \pm 0.5 \text{ nN}$ pour une vitesse de tirage de $10 \mu\text{m}/\text{min}$ équivalente à un taux de charge $L_r = v_{\text{pip}} \cdot k_{\text{fibre}} \sim 300 \text{ pN/s}$ environ (on suppose ici que la rigidité de la comète est grande devant la rigidité de la fibre). L'énergie d'adhésion, qui est donnée par l'intégrale sous la courbe force extension, est de l'ordre de 5.10^5 kT . On voit donc que les *Listeria* ne risquent pas de s'échapper de leur comète simplement sous l'effet des fluctuations thermiques. Il serait pertinent de connaître la contrainte seuil de rupture pour remonter à une force par molécule. Malheureusement, la surface recouverte de gel n'est pas accessible et l'on ne peut fournir qu'une valeur minimale pour cette contrainte en prenant en compte toute la surface. On obtient $\sigma_r = 0.24 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$. On peut estimer la densité d'activateur à la surface à partir des travaux de Wiesner et coll. (Wiesner, Helfer et al. 2003) ce qui nous donne une densité de l'ordre de $10^{-2} \text{ molécules}/\text{nm}^2$. On en déduit une force par filament avant la rupture de $2,4 \cdot 10^{-2} \text{ pN}$. Cette valeur est beaucoup trop faible puisqu'on s'attend à des forces de l'ordre de la dizaine de piconewtons (Upadhyaya and van Oudenaarden 2003). Cette écart est dû au fait qu'en faisant ce calcul, on surestime fortement le nombre de molécules N-WASp attachées à des filaments d'actine. Premièrement, toutes les molécules de N-WASp adsorbées ne sont pas forcément fonctionnelles (suivant la manière avec laquelle elles ont été adsorbées ou si elles ont été dénaturées au moment où la poignée flexible est à l'air). Deuxièmement, les études de microscopie électronique mentionnées dans l'introduction (Cameron, Svitkina et al. 2001) indiquent qu'à un instant donné, seule une fraction des molécules d'activateur (ActA dans leur cas) est liée au gel. Il serait donc intéressant d'avoir une estimation de ce nombre. Les

comètes réalisées dans ces conditions sont trop denses pour pouvoir faire un comptage en microscopie électronique. Il faut donc trouver une autre méthode.

III.4. Croissance contre un obstacle flexible.

Cette expérience constitue à priori l'expérience la plus facile à réaliser. Une fois la comète attachée, on suit simplement l'évolution de la déflexion en fonction du temps. L'allongement de la comète est égal à cette déflexion. Il rend compte de la croissance et de la compression élastique puisque la comète est contrainte entre la bille et la micropipette. La vitesse de la bille est la dérivée de cette déflexion. En pratique, le zéro de force est mesuré de la même manière que pour toutes les expériences avant attachement. Ensuite la force est mesurée toute les 0.3 secondes environ (suivant la taille de l'image de tracking). Une image est prise toutes les 10 secondes. Un exemple d'une telle expérience est illustré par la figure III.9.

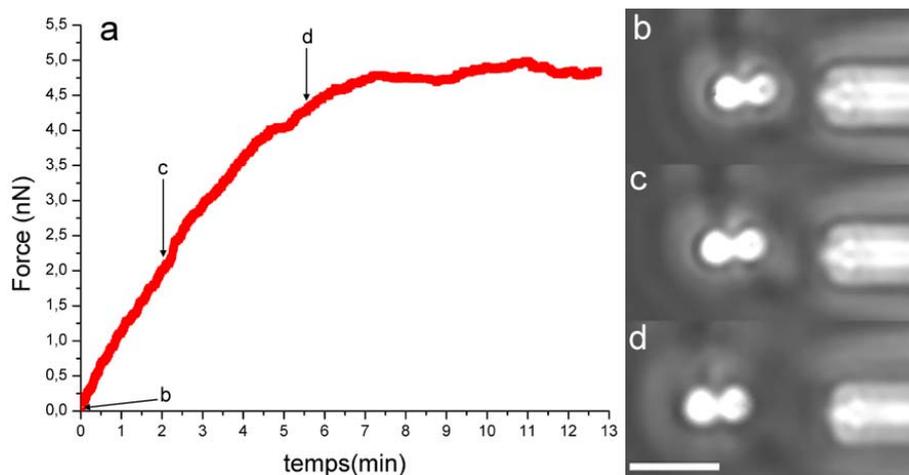


Figure III.9 Croissance contre un obstacle flexible. a : force en fonction du temps. b-d : séquence d'images correspondantes

On voit que la force augmente avec la croissance de la comète jusqu'à saturer à une valeur proche de 5 nN ou la croissance s'arrête. On peut alors dire que la « stall force » ou force d'arrêt est de 5 nN. Il s'agit de la seule expérience de ce type pour lequel il semble qu'il y ait véritablement arrêt de la polymérisation. La plupart du temps, la mesure de la force d'arrêt est impossible. En effet, différents événements se produisent suivant les conditions. Si la comète est trop longue, elle flambe par une instabilité élastique. On peut calculer la force seuil de ce flambage. Si l'on considère que la comète est encastrée à ses deux extrémités, la force seuil de

flambage est donnée par la formule : $F = 4 \frac{\pi^3 ER^4}{L^2}$ (Landau 1967). En prenant des valeurs

typiques ($R=2\mu\text{m}$, $E=5000\text{Pa}$, $L=5\mu\text{m}$) on trouve une force de l'ordre de 20nN . La comète n'a donc a priori pas de raison de flamber. Ce calcul est fait dans le cas idéal où la pipette est parfaitement alignée avec la bille et que la comète est droite. Dans la plupart des cas ceci n'est pas vrai. Il y a toujours un petit décalage entre la bille et la pipette et les comètes poussent rarement droites. La valeur seuil diminue dans le cas d'un décalage entre le point d'application de la force suivant l'axe de la comète jusqu'à 16 fois moins que celle du cas précédent, c'est à dire 1.5nN . Le flambage peut donc apparaître très tôt dans l'expérience. Un autre phénomène rend la mesure difficile. Il s'agit de l'influence de la contrainte sur la polymérisation. Si la force appliquée n'est appliquée de manière symétrique ou si la comète est un peu courbée au départ, la contrainte sur la surface de la bille n'est pas homogène. Il en résulte que le gel va pousser à des vitesses différentes suivant l'emplacement comme le montre le dessin de la figure III.10. Il va donc se produire une sorte de « flambage de croissance » qui va accentuer l'asymétrie.

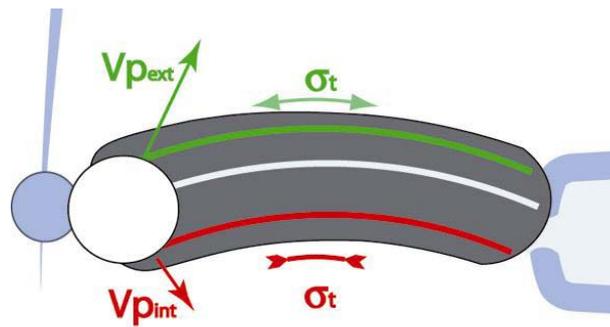


Figure III.10 Croissance courbée due à une contrainte non homogène

Enfin, il arrive aussi que la poignée flexible ne reste pas dans le plan focal sous l'action de la force exercée par polymérisation. En effet, si l'axe de propulsion de la comète ne coïncide pas avec l'axe micropipette-bille, un couple s'exerce sur la poignée. Dans ce cas, la force mesurée n'est que la projection dans le plan focal de la force réellement appliquée. Il s'avère donc que si la réalisation de cette expérience est facile, son succès est peu probable en raison de tous les phénomènes qui peuvent survenir. Nous allons voir dans le paragraphe suivant que l'application d'une force constante élimine une part des problèmes rencontrés ici. Si le flambage peut toujours intervenir, l'effet dits de « flambage de croissance » est réduit.

III.5 Expériences à force constante et relation force vitesse.

La relation force vitesse est déterminée et interprétée à partir de l'analyse élastique. Pour cela, une force constante est appliquée au moyen d'une boucle de rétroaction qui relie la mesure de position au déplacement imposé à la micropipette. La vitesse avec laquelle la comète s'allonge est calculée et fournit un point de la relation force vitesse. Les forces appliquées vont de -1.25 à 4.3nN .

III.5.1 Application d'une force constante par rétroaction

La rétroaction consiste à asservir la position de la bille, déterminée en fonction de la force à appliquer, en corrigeant la position de la micropipette. Elle est mise en œuvre comme suit. Une étape d'initialisation est réalisée avant l'attachement de la comète dans laquelle on fixe les paramètres de la rétroaction (voir annexe) dont la force à appliquer, la rigidité de la poignée, la correction maximale (max : $0,1\mu\text{m}$ en général). La contrainte en position est la force divisée par la rigidité de la poignée. Ensuite le tracking est lancé, les images acquises et la mesure de position effectuée comme il a été expliqué en III.2. A chaque pas, un sous programme visual basic réalise la rétroaction. Le schéma de la figure III.11 en montre le principe. Entre chaque track, la position de la bille est soustraite de la contrainte pour donner l'erreur de position e . La valeur absolue de cette erreur est ensuite conditionnée pour être éventuellement modifiée : si elle est supérieure à la correction maximale, c'est cette correction qui devient l'erreur (affectée du signe de cette erreur) ; si elle est inférieure à la précision, l'erreur prend la valeur zéro ; enfin si elle se situe entre les deux, l'erreur n'est pas modifiée. Il est nécessaire d'introduire une correction maximale pour ne pas avoir de correction trop grande (notamment au début) et arracher la comète. L'erreur résultante est ensuite retranchée à la précédente position du piézo qui est alors envoyée à l'amplificateur qui le répercute sur la micropipette. Une nouvelle image est ensuite prise et un nouveau track réalisé. Cette boucle est donc une rétroaction proportionnelle de coefficient multiplicateur unité. La variable de contrôle est la position de la micropipette et la variable asservie, la position de la bille.

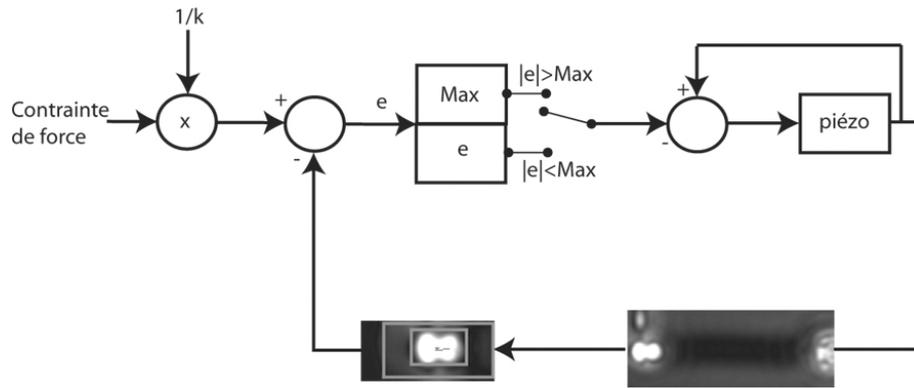


Fig. III.11 Schéma de principe de la rétroaction

Sur la figure III.12 est représenté un exemple du résultat d'une rétroaction. La position au cours du temps et l'écart à cette position y sont représentés. Une force de $1,7\text{nN}$ étant imposée au système et la poignée ayant une rigidité de $2,25\text{ nN}/\mu\text{m}$, la contrainte en position est donc de $0,755\mu\text{m}$. La fréquence d'échantillonnage est de $2,6\text{Hz}$ sauf lorsque une image de visualisation est acquise (toutes les 11s environ) auquel cas elle est de 1Hz . On observe sur la position au cours du temps des bouffées d'amplitude. Elles correspondent à des oscillations de la boucle. Outre la présence d'éléments élastiques, la discrétisation amplifie la tendance d'un système à osciller. En effet, si la boucle prend un peu de retard, ce qui arrive lorsqu'une image de visualisation est prise par exemple, la correction devient grande et si le système relaxe plus vite que la fréquence d'échantillonnage, la position traverse la contrainte en la dépassant. La correction change alors de signe mais la boucle a toujours du retard et le phénomène se répète. Ce sont ces oscillations qui constituent la source d'erreur instantanée de la boucle. A cette erreur instantanée s'ajoute une erreur moyenne qui peut apparaître suivant les paramètres de la boucle. Dans l'exemple présenté, l'écart à la contrainte en position a une valeur moyenne de $0,01\mu\text{m}$ et une déviation standard de $0,02\mu\text{m}$ (qui est la valeur moyenne de l'erreur instantanée). On a donc une erreur de position de $0,03\mu\text{m}$. Si on s'intéresse à la force, la force mesurée a une valeur moyenne de $1,72\text{ nN}$ et une déviation standard de $0,04\text{nN}$.

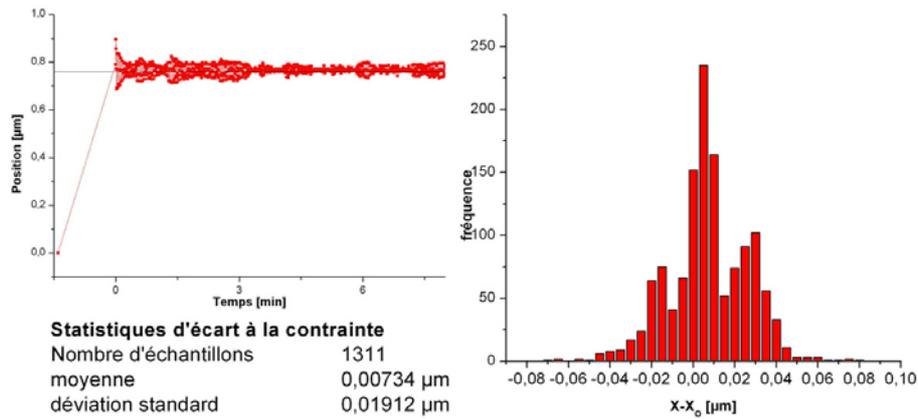


Fig. III.12 suivi de la position dans une expérience à force constante. A : position au cours du temps. B : histogramme des écarts à la contrainte.

Les erreurs ainsi calculées dépendent de la rigidité à deux titres. Premièrement simplement par le facteur à appliquer à la position pour avoir une force. Deuxièmement, la rigidité de la fibre intervient dans la fonction de réponse du système global (bille+comète+fibre). Pour illustrer cet aspect, considérons notre système comme figé et recherchons la fonction de transfert de la boucle. Si on cherche à calculer la fonction de réponse du système libre (sans rétroaction) et que l'on prend en compte le temps de relaxation de la fibre on doit écrire l'équilibre appliqué à la bille:

$$-k_f \tau \dot{x}_b + k_f x_b = k_c (x_m - x_b)$$

où x_b et x_p sont respectivement les positions de la bille et de la comète, k_f la raideur de la fibre et k_c celle de la comète et enfin τ est le temps de relaxation de la fibre repérés dans la figure III.13. On fait l'hypothèse ici que la polymérisation n'intervient pas (pas de forces internes et k_c constant).

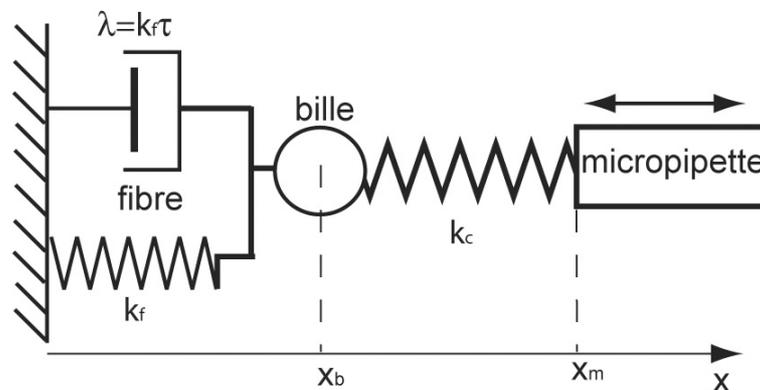


Fig. III.13 Système modèle figé.

La fonction de réponse libre s'obtient en prenant la transformée de Laplace de cette équation.

On trouve : $\frac{X_b}{X_m} = \frac{\kappa}{(1 + \kappa) - \tau s}$ où $\kappa = \frac{k_c}{k_f}$ est le rapport des rigidité

Si on veut maintenant la fonction de réponse du système bouclé on écrit simplement que

$x_m = x_b^0 - x_b$ où x_b^0 est la consigne et on en déduit : $G(s) = \frac{X_b}{X_b^0} = \frac{\kappa}{(1 + 2\kappa) - \tau s}$. Ce calcul a le

mérite de montrer que la réponse du système dépend du rapport des raideurs. Il illustre aussi le fait qu'on peut avoir une erreur à fréquence nulle ($s=0$) donc en régime stationnaire qui est non nulle ($\kappa/(1+2\kappa)$ dans cet exemple). La vraie fonction de transfert du système est bien sûr différente pour diverses raisons (croissance de la comète, discrétisation du signal...). On voit d'après les mesures que l'erreur stationnaire est dans notre cas extrêmement faible. Cela est peut être du au fait que le rapport $\kappa = \frac{k_c}{k_f}$ est grand devant un dans la majeure partie des cas.

Enfin, aux fréquences auxquelles on travaille, le temps de relaxation de la fibre est négligeable puisqu'il est de quelques centaines de microsecondes alors que la fréquence d'échantillonnage est de 2 à 3Hz.

III.5.2 Mesure d'un couple force vitesse.

Pour décrire le diagramme force vitesse, la vitesse associée à chaque force appliquée doit être mesurée. Il s'agit de la vitesse à laquelle la comète s'allonge alors que le système bille comète est soumis à une force extérieure en régime stationnaire. Cet allongement est la variation de distance entre la bille et la micropipette, égale à la longueur de la comète à une constante près. Il est représenté par la courbe bleue de la figure III.13.B. Pour déterminer la zone de stationnarité sur laquelle s'applique la relation force vitesse, on recherche la période sur laquelle l'allongement est le plus proche d'une droite. Pour cela, on applique un fit linéaire à la courbe d'allongement (ligne rouge dans III.13B). On vérifie ensuite sur les images de visualisation la validité de cette séquence, c'est-à-dire si la comète est bien attachée, si la bille reste dans le plan focal ou si la comète ne flambe pas. Cette période de l'expérience constitue alors la zone de travail sur laquelle on va effectuer les calculs. Tout d'abord, on calcule la valeur moyenne de la force sur cette période ainsi que l'écart type pour connaître la force appliquée et l'erreur statistique. Dans le cas de la figure II.13A, on obtient une force $F=1,72 \pm 0,04 \text{ nN}$.

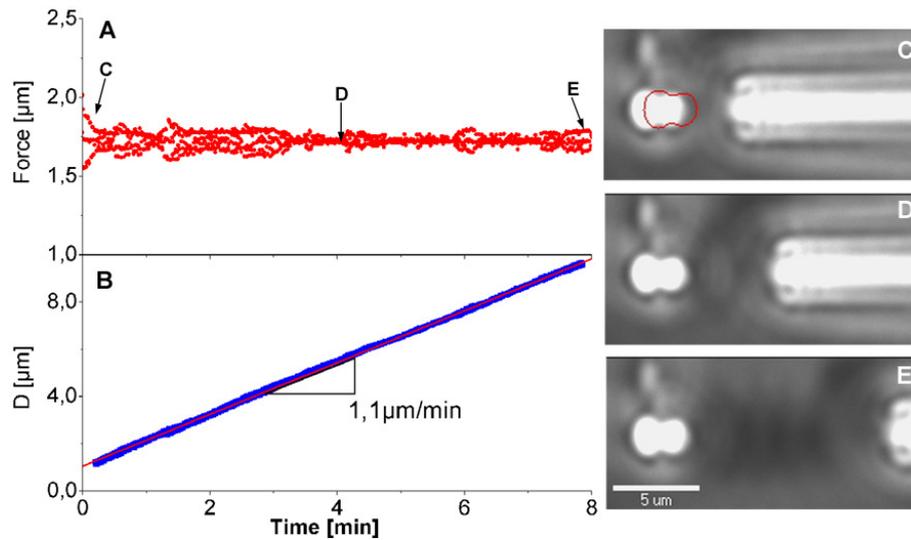


Fig. III.14 Mesure de la vitesse associée à une force. Les courbes A,B,C partagent la même base de temps. A : force, B :allongement (bleu) et son fit (rouge). C : dérivée de l'allongement (vert) et filtrage de la dérivée (rouge).D-H séquence d'images. Le contour rouge correspond à la force nulle.

Pour calculer la vitesse, on effectue un ajustement linéaire de la courbe d'allongement en fonction du temps. La pente de la droite obtenue est la vitesse ($1.1\mu\text{m}/\text{min}$ dans le cas présenté). On peut voir que cette vitesse est bien définie. Si l'on veut avoir une estimation de l'erreur, il faut calculer la dérivée de l'allongement de la comète. Cette dérivée a des variations très grandes dans le temps en raison des oscillations de boucle. Ces oscillations ne sont pas représentatives du phénomène de croissance car elles ont une fréquence caractéristique beaucoup plus grande que les échelles de temps qui nous intéressent (de l'ordre de la minute). Il faut donc filtrer la vitesse pour pouvoir ensuite calculer l'écart type des vitesses et obtenir ainsi l'erreur. Le choix de la fréquence de filtrage dépend de la précision temporelle que l'on veut avoir. L'erreur sur la vitesse stationnaire à une échelle de l'ordre de la minute est inférieure à 10%.

III.5.3 La relation force vitesse

III.5.3.a Construction de la courbe

Chaque expérience précédemment décrite permet de mesurer un point de la relation force vitesse. Pour chaque poignée flexible, entre 3 et 12 mesures ont été effectuées à des forces différentes. Mais si l'on veut regrouper des mesures provenant de poignées flexibles différentes, on doit procéder à une étape de normalisation. En effet, la surface de recouvrement de la protéine N-WASp sur la bille diffère d'une poignée à l'autre. D'autre part, l'activité

biochimique peut varier entre les différents lots de protéines qui ont été utilisés pour réaliser. Pour normaliser ces expériences, nous avons divisé les vitesses obtenues par la vitesse à force nulle mesurée pour chaque poignée. La surface recouverte de protéine sur la bille aurait été utilisée pour regrouper nos données puisque comme on va le voir chaque contribution à la force est proportionnelle à cette surface. Malheureusement, comme on l'a noté auparavant, cette grandeur n'est pas accessible. Les poignées flexibles dont la surface de recouvrement est trop faible (générant des comètes d'un diamètre inférieur à celui de la bille) ainsi que celles dont la vitesse à force nulle est trop basse (inférieure à la moitié de la vitesse moyenne de toutes les poignées utilisées) ont été éliminées. Enfin, les expériences effectuées à même force ont été moyennées. On aboutit finalement à la courbe représentée sur la figure III.16 qui regroupe 43 expériences provenant de 8 poignées flexibles différentes.

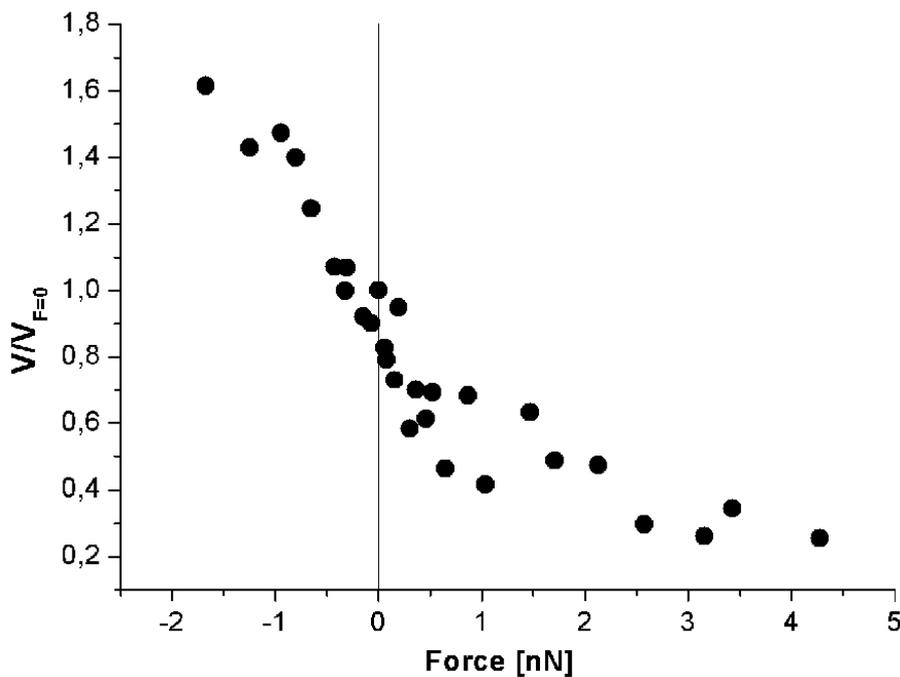


Fig III.16 Relation force vitesse. La vitesse normalisée est représentée en fonction de la force. La convention de signe est celle utilisée par la communauté à savoir des forces compressives positives.

III.5.b. Description des résultats et confrontation aux autres travaux.

La courbe force vitesse est ici représentée entre $-1,25$ et $4,3\text{nN}$. Elle présente une partie linéaire dans les forces négatives (dans le sens du mouvement de la bille) et une décroissance ralentie dans les forces positives (contre le mouvement). Il n'a pas été possible d'arrêter la croissance complètement même en appliquant une force de $4,3\text{nN}$ ce qui n'est pas étonnant puisque l'expérience du paragraphe précédent suggère que la force d'arrêt est au moins égale

à 5nN. Ce résultat est très différent de la relation obtenue par Mac Grath et coll. (McGrath, Eungdamrong et al. 2003). En effet, dans leur étude, la décroissance est telle que la bactérie *Listeria* perd presque 90% de sa vitesse dès 50pN alors qu'ici il faut dépasser les 4nN pour observer un tel ralentissement (voir la figure III.17). Les points de l'étude de Wiesner et coll. (Wiesner, Helfer et al. 2003) s'incrivent dans notre relation. En ce qui concerne les modèles, on peut dire que le modèle autocatalytique de Carlsson (Carlsson 2003) n'est pas en adéquation avec nos résultats. Le modèle EBR (Mogilner and Oster 2003) utilise des paramètres microscopiques qui nous sont inaccessibles. Il n'est donc pas pertinent de confronter nos résultats avec ce modèle.

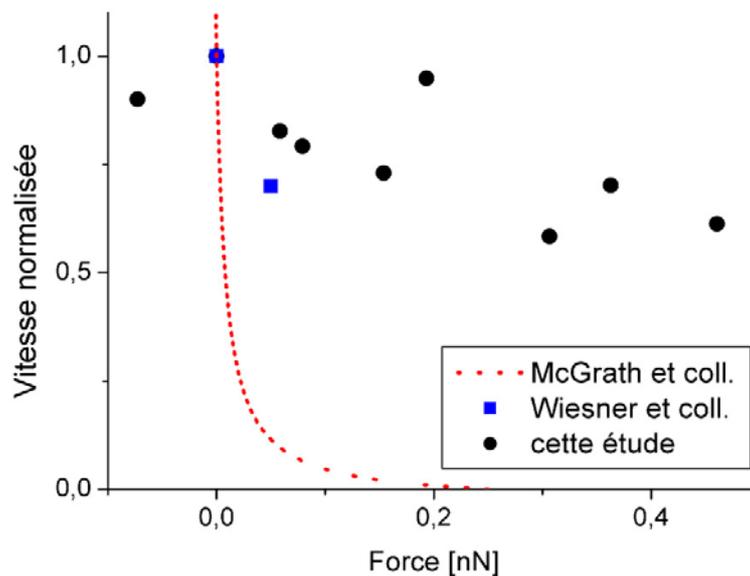


Figure III.17 Comparaison avec les autres travaux sur un zoom de la force entre -0.1 et 0.5nN.

III.5.3.c Explication du comportement à partir de l'analyse élastique

Nous allons maintenant expliquer le comportement de cette courbe à partir de l'analyse élastique initiée par Gerbal et coll. (Gerbal, Chaikin et al. 2000) en utilisant une formulation simplifiée fondée sur une approche dimensionnelle (Prost 2001) (déjà écrite en I.5.3). En symétrie sphérique, l'addition de monomères à la surface du gel génère une déformation de la couche de gel recouvrant la bille. La contrainte tangentielle associée est maximale sur la surface externe de la couche de gel et s'annule sur la surface interne. Elle s'intègre en une tension de la couche qui, en présence de courbure, se traduit par une contrainte normale similaire à une pression de Laplace à l'interface gel-bille. Cette contrainte normale crée une force propulsive F_{el} provenant de la polymérisation une fois intégrée sur la surface de la bille. La force externe crée une contrainte additionnelle dans le gel. Cette contrainte étant

conservative ($\nabla \underline{\underline{\sigma}} = \underline{\underline{0}}$), son intégration sur l'interface bille-gel est précisément égale à la force externe. Ainsi, cette force est entièrement transmise à cette interface. Le mouvement du gel relativement à la bille génère une friction F_{fric} due à l'interaction dynamique entre le gel et les activateurs de la polymérisation. Concentrons nous maintenant sur le cas plus simple d'une comète creuse (nous montrons en annexe que ceci est licite car la contribution de la partie interne de la comète est négligeable). Dans ce cas, la force externe et la force de propulsion peuvent être directement équilibrées par la force de friction à l'interface bille-gel :

$$F_{ext} + F_{el} + F_{fric} = 0 \quad [1]$$

F_{el} s'écrit $F_{el} \cong E \frac{e^3}{R}$ (Prost 2001) (voir I.5.3) . Notons qu'en principe, nous devrions utiliser

la formule $F_{el} = \frac{E}{R} e^3 (1 + \frac{e}{2R})$ Nous avons vérifié que cette approximation ne mène à aucun changement significatif. Nous supposons que le module élastique est constant et ne dépend pas de la force appliquée.

La force de friction s'écrit : $F_{fric} = -S\xi V$ pour des vitesses relatives du gel par rapport a la bille suffisamment faibles (Germal, Chaikin et al. 2000) (voir I.5.3). La relation dimensionnelle entre la force et la vitesse s'écrit alors:

$$F_{ext} + E \frac{e^3}{R} \cong S\xi V \quad [2]$$

Il faut maintenant exprimer la dépendance de l'épaisseur en fonction de la vitesse.

L'équation de conservation dans la couche de gel s'écrit :

$$\frac{\partial e}{\partial t} + \frac{\partial(Ve)}{\partial x} = V_p(e) \text{ soit en régime stationnaire :}$$

$$\frac{\partial(Ve)}{\partial x} = V_p(e) \quad [3]$$

Si l'on se place proche des conditions d'arrêt, l'épaisseur de gel est celle du régime stationnaire obtenu en symétrie sphérique en absence de brisure de symétrie e^* (Noireaux, Golsteyn et al. 2000). On a alors $V_p(e^*) = 0$. En développant au premier ordre la vitesse de

polymérisation autour de e^* , on trouve $V_p(e^* + \delta e) = \delta e \frac{\partial V_p(e^*)}{\partial x}$. En combinant cette dernière

relation avec la relation [3], on en déduit la dépendance de l'épaisseur en fonction de la

variable d'espace : $e(x) = e^* (1 - \exp(-\frac{|\partial V_p / \partial x|(e^*)}{V} x))$.

Pour $x=R$, l'épaisseur atteint la valeur e^* . En approximant la dérivée spatiale de la vitesse de

polymérisation par le rapport $\frac{V_p^0}{e^*}$ on trouve finalement

$$e(V) = e^* (1 - \exp(-\frac{V_p^0 R}{V e^*})) \quad [3]$$

Cette formule possède deux limites naturelles. Pour des faibles vitesses proches de la condition d'arrêt, l'épaisseur est e^* . Pour les grandes vitesses, l'épaisseur est donnée par le produit de la vitesse de polymérisation sans contrainte V_p^0 multipliée par le temps (R/V) passé par le gel à la surface de la bille $e = R(V_p^0 / V)$.

L'épaisseur est expérimentalement accessible dans les expériences à force constante. En effet, en mesurant le diamètre ϕ de la comète, on calcule l'épaisseur par la formule $e=(\phi - 2R)/2$ en négligeant la variation de diamètre le long de la comète. Cette mesure a été effectuée pour deux poignées flexibles différentes. L'épaisseur est alors tracée en fonction de l'inverse de la vitesse normalisée (Fig. III.18).

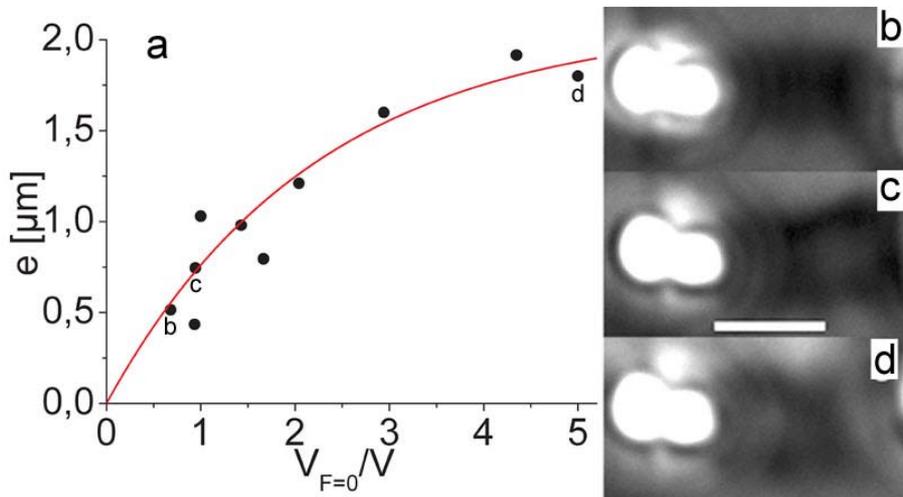


Fig. III.18. Epaisseur du gel. a : épaisseur en fonction de l'inverse de la vitesse normalisée (ronds noirs) et ajustement avec l'équation [3] (ligne rouge). b-d : images pour différentes valeurs de la vitesse. Barre $5\mu\text{m}$.

L'ajustement de l'épaisseur par la relation [3] en fonction des paramètres e^* et V_p^0 est satisfaisant. On en déduit $e^* = 2.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ et $V_p^0 / V_{(F=0)} \cong 0.9 \pm 0.3$ ce qui donne une estimation de la vitesse de polymérisation à contrainte nulle $V_p^0 \cong 1.6 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{min}$.

On a maintenant une relation pour laquelle la force est une fonction de la vitesse.

$$-F_{\text{ext}} \cong E \frac{e^{*3}}{R} (1 - \exp(-\frac{V_c}{V}))^3 - S\xi V \quad [4]$$

où $V_c = \frac{V_p^0 R}{e^*}$ est une vitesse caractéristique.

La relation [4] met en jeu seulement 2 paramètres inconnus qui sont le module d'élasticité E , le coefficient de friction ξ (la vitesse de polymérisation à contrainte nulle V_p^0 et l'épaisseur limite e^* ayant été déterminés grâce aux mesures d'épaisseur). La relation force vitesse est alors ajustée en fonction de ces deux seuls paramètres (Fig.III.19).

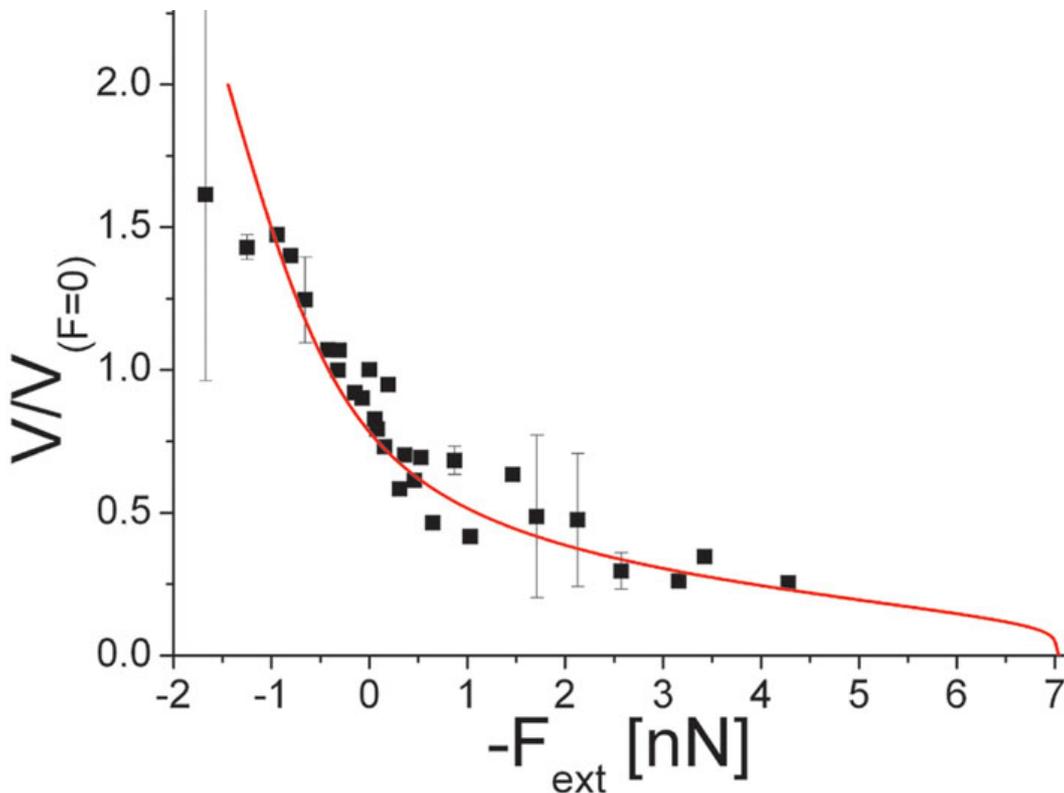


Fig III.19. Ajustement de la relation force vitesse (carrés noirs) avec l'équation [4] (ligne rouge).

Pour les grandes forces positives (partie gauche de la Fig.III.19), le terme de friction domine. Pour des forces proches de zéros, il existe un équilibre entre la force de friction et la force élastique de propulsion. Pour des forces négatives suffisamment fortes, la réponse est essentiellement due à la force élastique. Etant donné que l'épaisseur augmente au fur et à mesure qu'une force s'oppose à l'avancée de la bille, le mouvement présente un renforcement naturel. Les valeurs obtenues sont $\xi \cong 3.10^{10}$ Pa.s/m et $E \cong 10^3$ Pa. Les équations utilisées pour ajuster les données expérimentales étant des relations dimensionnelles, ces valeurs n'ont de signification qu'à un ordre de grandeur près. Il est tout de même intéressant de noter que la valeur du module élastique est en accord à un facteur 4 près avec celle trouvée indépendamment lors de tirages rapides. De même, la valeur du coefficient de friction se trouve dans la gamme prédite par Gerbal et coll. (Gerbale, Chaikin et al. 2000). Le rapport $E / \xi = V_i$ est une vitesse caractéristique de l'interaction gel-bille (Prost 2001). On trouve $V_i \cong 2\mu\text{m}/\text{min}$ comparable à V_p^0 . La similarité entre les deux valeurs n'est pas entièrement fortuite : une grande différence génèrerait une contrainte forte à l'interface bille-gel qui engendrerait des comètes creuses(Gerbale, Chaikin et al. 2000). C'est ce qui advient lorsqu'on est proche de la condition d'arrêt comme on peut le voir sur l'image Fig. III.19d. Dans ce cas c'est la force extérieure qui induit la formation de comète creuse.

Enfin, le fit permet de prévoir une force d'arrêt (stall force) qui est de 7nN.

Si l'on s'intéresse maintenant à la puissance, on peut calculer la puissance utile en écrivant que c'est la dérivée du travail effectué contre la force externe dans le sens de la propulsion. Elle est donc donnée par le produit FxV . La figure III.20 montre la puissance en fonction de la force appliquée calculée en nombre d'ATP hydrolysé par secondes. Elle est bien sûr fournie au système pour les forces négatives et produite par ce système pour les forces positives. On voit que la puissance calculée à partir de l'analyse élastique avec les mêmes paramètres que ceux ajustés pour la force rend bien compte d comportement.

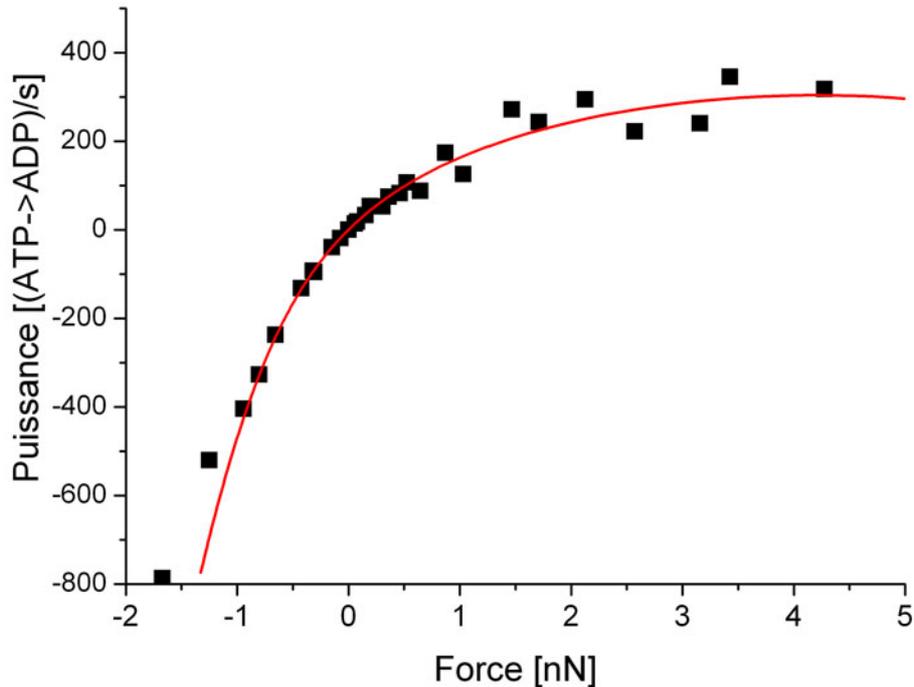


Figure III.20 Puissance en fonction de la force. Points expérimentaux (carrés noirs) et calcul à partir de l'équation (2) avec les mêmes paramètres que pour l'ajustement de la force-vitesse.

Il est possible de calculer grossièrement la puissance fournie par polymérisation. La quantité d'actine N_0 présente dans des comètes d'environ $L_0=10\mu\text{m}$ a été mesurée par Wiesner et coll.(Wiesner 2003). On peut alors remonter à la quantité d'actine présente dans les nôtres en

écrivant que $N_{(F)} = \frac{Sc_{(F)} \int_0^t v_{(F)} \pi d\tau}{S_0 L_0} N_0$. Si l'on suppose que pour chaque monomère d'actine

ajouté au gel, une molécule d'ATP est consommée (on néglige l'ATP consommé par Arp2/3) on peut remonter aux taux d'ATP consommé en fonction de la vitesse :

$\frac{dN}{dt} = \frac{Sc_{(F)} v_{(F)}}{S_0 L_0} N_0$. Si on écrit maintenant que la vitesse de polymérisation est constante, on

trouve que ce taux est indépendant de la force et vaut : $\frac{dN}{dt} = \frac{v_0}{L_0} N_0 \approx 2 \cdot 10^5 \text{ ATP/s}$. Ainsi, le

travail utile représente au maximum seulement 2/1000 de l'énergie dissipée.

La conclusion importante est que l'on peut expliquer le comportement du système avec succès grâce à cette approche sans tenir compte de l'aspect microscopique de la polymérisation. Cette analyse est donc insensible aux modèles microscopiques considérés qui ne constituent qu'une condition aux limites de l'analyse élastique.

Nous avons négligé deux aspects dans cette approche. Premièrement, nous avons considéré que le module d'Young était constant avec la force appliquée. Pour qu'une augmentation du module ait un effet comparable à l'augmentation de la force due à l'épaisseur, elle doit être de l'ordre d'un facteur 10, ce qui n'a pas été observé suite à des mesures de module après des expériences de force. Deuxièmement, nous avons supposé que la contrainte radiale est homogène sur la surface de la bille. On peut voir sur les images de la figure III.18 que les comètes sont moins denses à l'intérieur ce qui va dans le sens d'une contrainte inhomogène. Bien que les conditions aux limites soient différentes, on peut supposer que la répartition des contraintes est similaires à celle mesurée sur les gouttes d'huile (Boukellal 2003) ou sur des vésicules (Giardini, Fletcher et al. 2003; Upadhyaya, Chabot et al. 2003) c'est à dire des contraintes compressives sur le côté et rétractiles à l'arrière. Pourtant, cela ne change pas fondamentalement l'analyse. Les expériences sur les vésicules indiquent que le gel peut être divisé en deux parties.

III.5.3. Limites de l'expérience

L'amplitude des forces est limitée par le flambage élastique de la comète dans les forces positives et une instabilité de la vitesse suivi d'une rupture dans les forces négatives. Cette instabilité sera décrite dans le paragraphe II.4.3. En ce qui concerne les forces positives (contre le mouvement) le flambage intervient une fois que la comète atteint la longueur limite définie par la force seuil (il n'est toutefois pas possible de la calculer exactement car on n'en connaît pas bien les conditions aux limites). On peut toutefois noter que les expériences à force constante échouent beaucoup moins souvent que les mesures à micropipette fixe (paragraphe III.4.2) car on impose en quelque sorte la symétrie. En effet, en déplaçant la pipette, on favorise la relaxation du gel dans l'axe bille-micropipette. Cet effet est plus clair dans le cas d'une force négative, car on voit que la symétrie est brisée par application de la force puisqu'on est capable de redresser des comète (voir la figure III.7 par exemple).

III.5 Vitesse imposée. Instabilité dynamique de type de stick-slip.

Des expériences à vitesse de micropipette constante nous ont permis d'observer la transition vers une instabilité dynamique de stick-slip similaire à celles déjà vues avec des billes recouvertes de VCA.

III.5.1 Description des résultats

Il s'agit exactement du même protocole que pour les tirages rapides mis à part la vitesse de micropipette qui est plus lente. Lorsque le système est soumis à un tirage à une vitesse un peu supérieure à sa vitesse à force nulle, la force monte puis se stabilise à un plateau une fois que la vitesse de croissance est égale à la vitesse de micropipette. Durant la montée, l'épaisseur du gel diminue pour lui aussi atteindre une valeur stationnaire (voir l'image de la figure III.21).

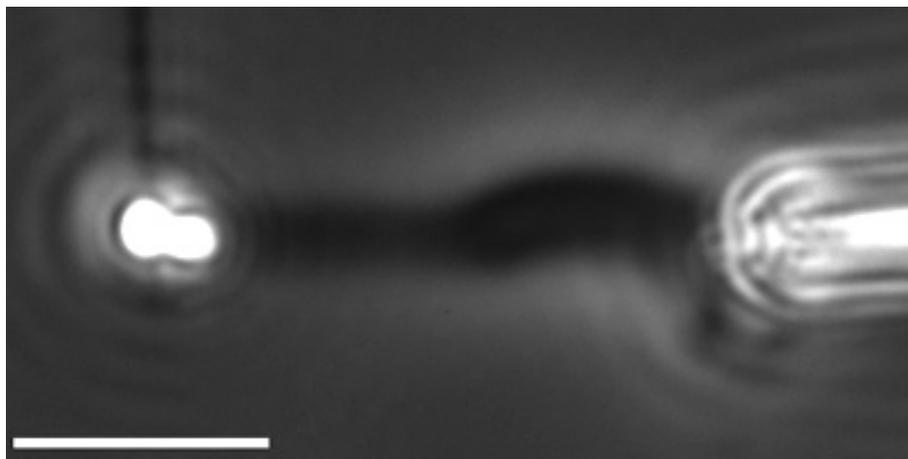


Figure III.21 Adaptation de l'épaisseur à la vitesse de tirage. La vitesse de tirage $v=5\mu\text{m}/\text{min}$ et la vitesse à force nulle $V_0=2.5\mu\text{m}/\text{min}$. On peut noter le redressement de la comète du à la force. barre de calibration $10\mu\text{m}$

Si on augmente la vitesse de tirage, on observe une transition vers un régime oscillant. La figure III.22 montre le comportement au cours du temps de la force et de la vitesse pour des vitesses de tirage incrémentées de $0.5\mu\text{m}/\text{min}$. La vitesse à force nulle pour cette poignée est de $1.8\mu\text{m}/\text{min}$. Pour $4\mu\text{m}/\text{min}$, on peut voir que la vitesse se stabilise à la vitesse de tirage et la force à une valeur stationnaire. Si on augmente la vitesse on observe une diminution du temps de montée de la force puis le même phénomène. A $5\mu\text{m}/\text{min}$, il y a un dépassement de la force puis de faibles oscillations amorties. On est alors en régime sous critique. Pour $5.5\mu\text{m}/\text{min}$, on observe des oscillations assez régulières. Ces oscillations sont présentes à plus forte vitesse mais leur fréquence semble diminuer.

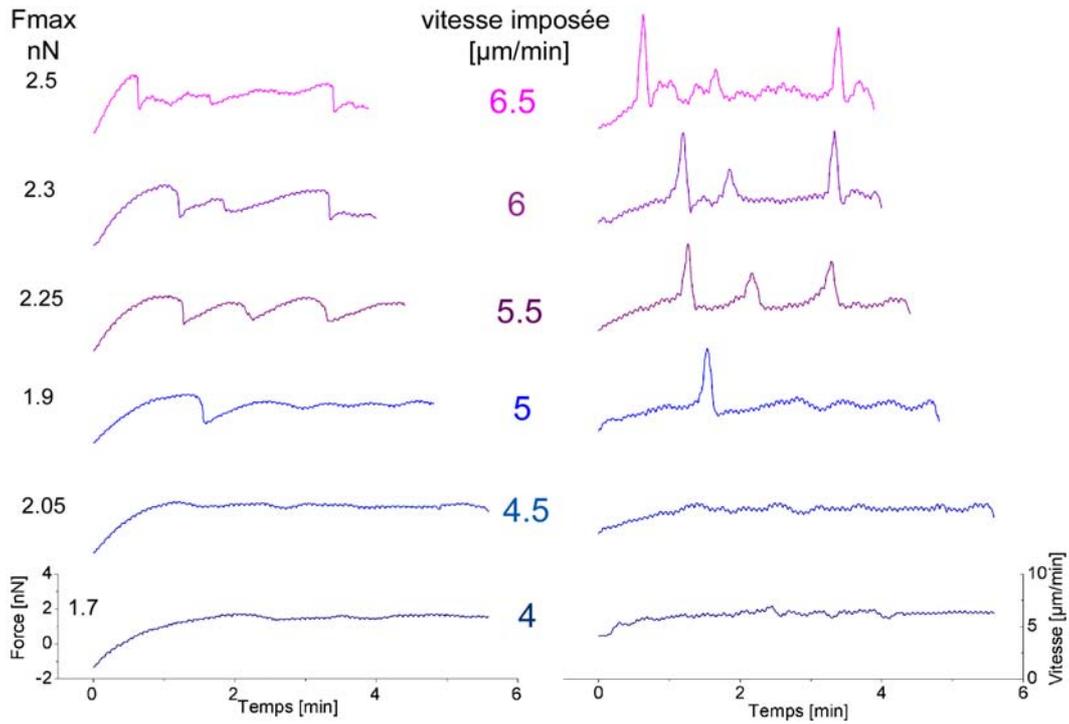


Figure III.22 Transition vers l'instabilité en augmentant la vitesse de tirage.

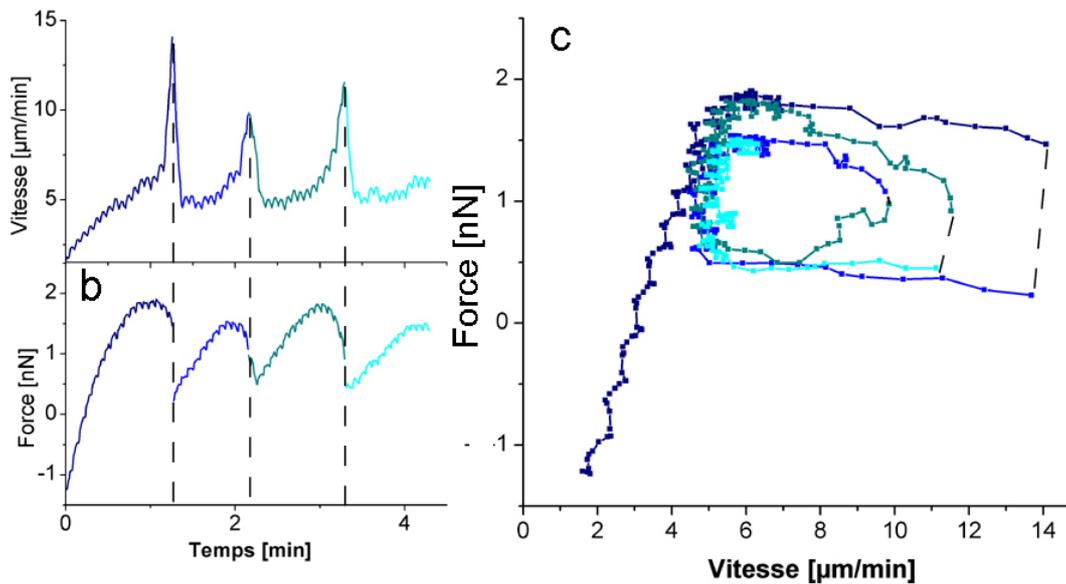


Figure III.22 Oscillations à $5.5\mu\text{m}/\text{min}$. a : vitesse en fonction du temps. b : force en fonction du temps. Diagramme force vitesse. Les couleurs correspondent aux mêmes séquences temporelles dans toutes les figures

La figure III.23 illustre en détail les oscillations à 5.5µm/min. Comme pour les vitesses faibles, on observe une montée en force jusqu'à un maximum de 2.25nN. Une fois cette force maximale atteinte, il y a une forte augmentation de la vitesse qui culmine à un maximum puis retombe aussi brusquement. Le force augmente alors de nouveau et un nouveau cycle commence. Si on regarde les séquences correspondantes dans le diagramme force vitesse, on observe la montée du début (qui est linéaire comme le diagramme force vitesse de la partie III.4). Une fois arrivé à la force seuil, il a un passage rapide (l'espacement des points augmente) vers la vitesse maximale puis une retour à la vitesse basse avant la montée. Le cycle recommence et décrit le même chemin à la montée. On ne retrouve pas exactement la même vitesse maximale suivant les cycles. La corrélation du mouvement avec la densité du gel est illustrée par la figure III.23. Il s'agit d'une expérience différente de celle montrée en III.22. On voit que la montée en force coïncide avec une forte densité de gel. Le régime rapide correspond lui à une faible densité. Le minimum de vitesse est atteint juste avant de recommencer un gel plus dense. La corrélation du mouvement avec la densité du gel est illustrée par la figure III.23. Il s'agit d'une expérience différente de celle montrée en III.22. On voit que la montée en force coïncide avec une forte densité de gel. Le régime rapide correspond, lui, à une faible densité. Le minimum de vitesse est atteint juste avant de recommencer un gel plus dense.

III.5.2 Interprétation

La transition vers un régime saltatoire par augmentation de la vitesse est la manifestation du même phénomène que pour la transition observée en augmentant la taille des billes recouvertes de VCA dans les extraits. La source de ces oscillations provient du comportement de la force de friction en fonction de la vitesse déjà décrit dans l'introduction. L'interprétation des expériences de tirage est donc sensiblement la même. Dans le chapitre I, nous avons déjà vu que la force de friction pouvait s'écrire :

$$f_f = f_i + \frac{\xi_s}{C_s} v \quad \text{avec} \quad f_i = \begin{cases} \frac{\xi_i}{C_s} v & v \ll 1 \\ \frac{nW_b^2}{\tau_c K v} & v \gg 1 \end{cases} \quad (\text{Bernheim-Groswasser, Prost et al. 2003})$$

A faible vitesse, un nombre moyen conséquent de filaments est connecté à la surface et le coefficient de friction est grand. Dans le régime à forte vitesse, ce nombre est proche de zéro et seule la friction entre les deux matériaux que sont le gel et la bille subsiste. Entre les deux,

la dépendance en $1/v$ génère une branche sur laquelle la force de friction décroît avec la vitesse et qui est donc instable. La courbe de friction est sensiblement la même dans notre cas. Par contre, il y a deux différences majeures.

- Premièrement, dans le cas du tirage à vitesse imposée, la force de propulsion élastique est quasiment nulle (du moins proche de la transition). On peut s'en convaincre par la diminution de l'épaisseur illustrée dans la figure III.21. Le point de fonctionnement est donc défini par l'égalité: $-F_{ext} = F_f$. La courbe force vitesse de la figure III.22 représente la variation de F_{ext} en fonction de la vitesse. On retrouve les aspects essentiels décrits dans la partie I.5.3.d.
- Deuxièmement, la transition est observée en passant d'un régime de vitesse lent à un régime rapide. Cela veut dire que des billes de $2\mu\text{m}$ recouvertes de N-WASp travaillent dans la branche à friction forte (faibles vitesses).

On peut maintenant expliquer l'oscillation. Lorsque la vitesse de tirage augmente, on se déplace sur la branche à friction forte à gauche de l'instabilité. Une fois arrivé dans cette zone, la force augmente jusqu'à la force F_{th} . Il advient alors une rupture catastrophique des filaments qui est associée avec un pic de vitesse V_{max} alors que le gel glisse. Une fois la force relaxée par glissement, un gel plus dense peut être reconstruit. La bille retourne alors dans la branche de forte friction jusqu'à atteindre de nouveau la force seuil.

La différence entre les billes recouvertes de N-WASP et celles recouvertes de VCA en ce qui concerne leur situation dans la courbe de friction peut être expliquée. En effet on sait que l'activité de N-WASP en terme de taux de nucléation d'actine par activation d'Arp2/3 est plus forte d'un facteur 4.4 que celle de WASP dont est extraite VCA (Zalevsky, Lempert et al. 2001). Par ailleurs des observations préliminaires semblent montrer que seules les billes de N-WASp de faible diamètre produisent des oscillation et cela pour des densité faibles. Il s'agit d'observations très préliminaires une étude systématique doit être faite.

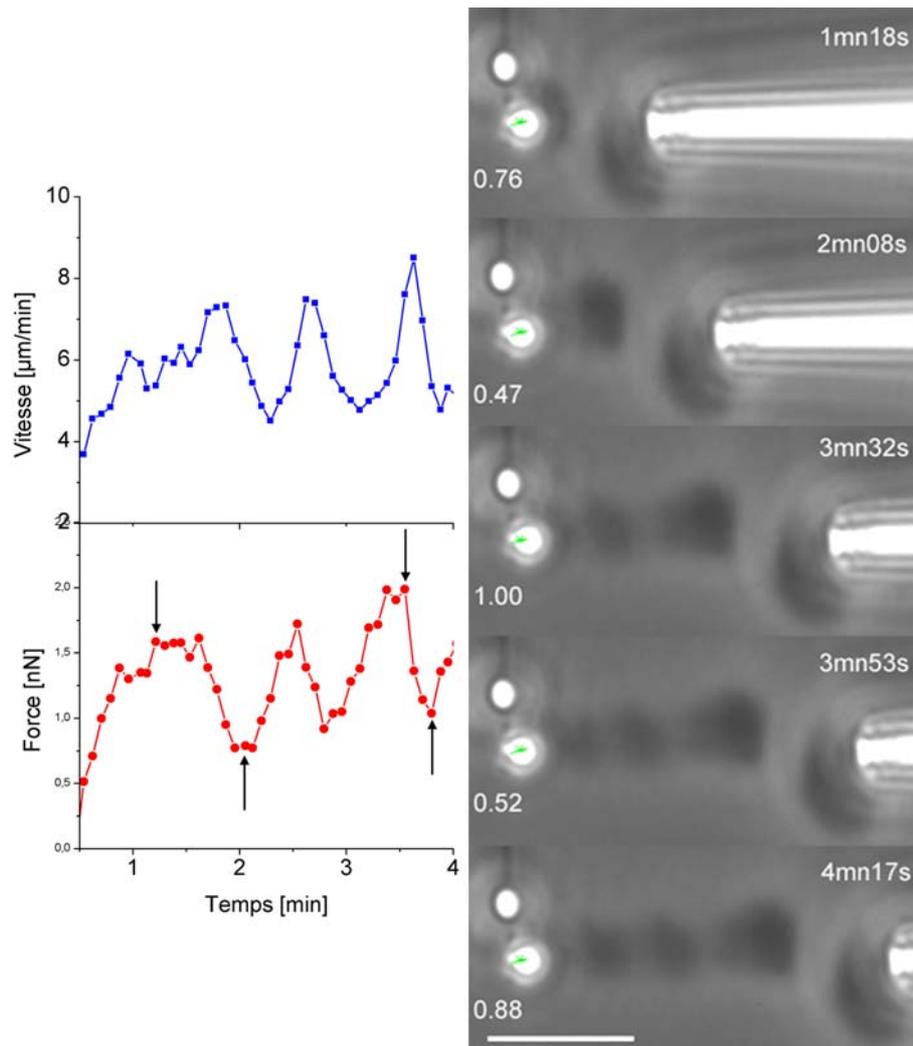


Figure III.23. Corrélation de la densité du gel avec la vitesse. LA vitesse est représentée en bleu. LA force est estimée car on n'a pas de calibration pour cette expérience. Les flèches indiquent la situation des quatre premières images dans la courbe de force. A droite : séquence d'image correspondante aux courbes. LE temps est indiqué en haut à droite et la valeur de la déflexion (en μm) en bas à gauche. Barre de calibration $10\mu\text{m}$.

Annexe

Relation [2] is valid for a hollow comet. However, except for experiments done with the highest forces (close to stall force), comets are not hollow. We thus need to examine the contribution from the inner part of the gel. The continuity of the gel requires that the polymerization velocity on the symmetry axis of the comet equals the bead gel relative velocity V . In the two gel picture this requirement implies that the outer part of the gel exerts a force $F_{in/out}$ on the inner part (36). This force results from the shear at the two gel interface and is transmitted to the inner gel-bead interface. Let us note S_{in} and S_{out} respectively the surface of contact between the inner (resp. outer) gel and the bead. This force translates into a normal

stress $\sigma_{in/out} = \frac{F_{in/out}}{S_{in}}$ at the inner gel-bead interface such that the polymerization rate

$V_p(\sigma_{in/out} + \sigma_{ext})$ on the symmetry axis equals V (where

$\sigma_{ext} = F_{ext}/(S_{out} + S_{in}) = F_{ext}/S$). The inner part of the gel exerts on the outer part a reaction force such that $F_{out/in} = -F_{in/out}$. Thus equation [1], which describes the dynamical behavior of

the outer gel, must be implemented to : $0 \cong F_{ext} \frac{S_{out}}{S_{in} + S_{out}} + F_{el} + F_{fric} + F_{out/in}$ where we take

into account the fact that now only a fraction $S_{out}/(S_{in} + S_{out})$ of the external force works on

the outer part of the gel. Inverting the relation $V_p(\sigma_{in/out} + \sigma_{ext}) = V$, we get

$$F_{out/in} = -S_{in} V_p^{-1}(V) + F_{ext} \frac{S_{in}}{S_{in} + S_{out}} \text{ and eventually}$$

$$0 \cong F_{ext} + F_{el} + F_{fric} - S_{in} V_p^{-1}(V) \quad [5]$$

Quite generally we can write $V_p^{-1}(V) = \sigma_0 f\left(\frac{V}{V_p^0}\right)$ where f is a model dependent dimensionless

function and $\sigma_0 \cong \frac{kT}{d^2 a}$ (in which d is the average distance between activators and a is of the

order of an actin monomer size). Similarly, the strength of the elastic force is scaled by the

elastic modulus E . In the experimentally accessible range, comparing these two terms

amounts to compare σ_0 and E . Taking the simple scaling $E = \frac{kT\lambda_p}{\lambda^4}$, where λ_p is the actin

filament persistence length and λ is the average distance between crosslinks in the gel, we get

$\frac{\sigma_0}{E} \cong \frac{\lambda^4}{\lambda_p d^2 a}$. With $\lambda_p \cong 15\mu\text{m}$, $d \cong \lambda \cong 10\text{nm}$ and $a \cong 5\text{nm}$, $\frac{\sigma_0}{E} \cong 2 \cdot 10^{-3}$. As a result, for most

practical purposes, the last term of equation [5] is negligible and the combination of equation

[4] may be directly compared to experiments, provided we know $e(V)$.

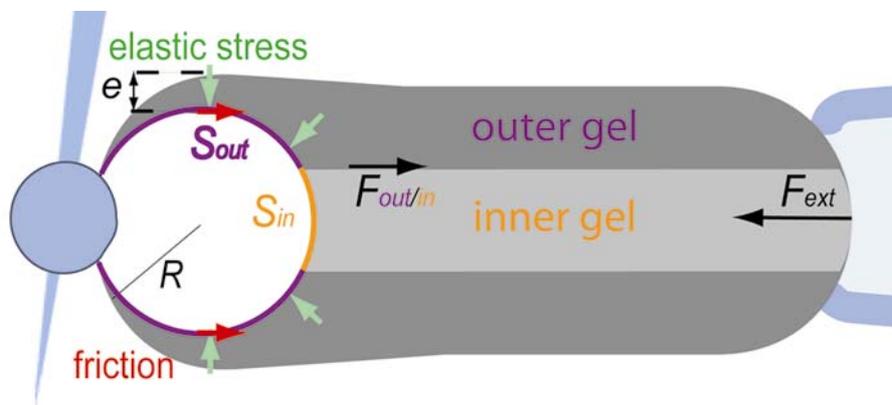


Fig. 6. Two gel picture. The inner gel (light grey) has a contact surface S_{in} with the bead. The outer gel (dark grey) has a contact surface S_{out} . The force exerted by the inner gel on the outer gel $F_{out/in}$ applies along the interface between the two gels.

- Bernheim-Groswasser, A., J. Prost, et al. (2003). "Mechanism of actin based motility: a dynamic state diagram." in preparation.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, et al. (2002). "The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters." Nature **417**(6886): 308-11.
- Cameron, L. A., M. J. Footer, et al. (1999). "Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4908-13.
- Cameron, L. A., T. M. Svitkina, et al. (2001). "Dendritic organization of actin comet tails." Curr Biol **11**(2): 130-5.
- Carlsson, A. E. (2003). "Growth velocities of branched actin networks." Biophys J **84**(5): 2907-18.
- Gerbal, F., P. Chaikin, et al. (2000). "An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion." Biophys J **79**(5): 2259-75.
- Gerbal, F., V. Laurent, et al. (2000). "Measurement of the elasticity of the actin tail of *Listeria monocytogenes*." Eur Biophys J **29**(2): 134-40.
- Giardini, P. A., D. A. Fletcher, et al. (2003). "Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6493-8.
- Houchmandzadeh, B., J. F. Marko, et al. (1997). "Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration." J Cell Biol **139**(1): 1-12.
- Landau, L. a. L., E. (1967). Theory of elasticity. Moscow, Mir.
- McGrath, J. L., N. J. Eungdamrong, et al. (2003). "The Force-Velocity Relationship for the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes*." Curr Biol **13**(4): 329-32.
- Mogilner, A. and G. Oster (2003). "Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments." Biophys J **84**(3): 1591-605.
- Noireaux, V., R. M. Golsteyn, et al. (2000). "Growing an actin gel on spherical surfaces." Biophys J **78**(3): 1643-54.
- Prost, J. (2001). The physics of *Listeria* propulsion. Physics of bio-molecules and cells, Les Houches, France, EDP Science; Springer Verlag.
- Upadhyaya, A., J. R. Chabot, et al. (2003). "Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4521-6.
- Upadhyaya, A. and A. van Oudenaarden (2003). "Biomimetic systems for studying actin-based motility." Curr Biol **13**(18): R734-44.
- Wiesner, S. (2003). Mécanisme moléculaire de la motilité cellulaire basée sur la polymérisation d'actine. Faculté des Sciences. Orsay, Paris XI.
- Wiesner, S., E. Helfer, et al. (2003). "A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility." J Cell Biol **160**(3): 387-98.
- Zalevsky, J., L. Lempert, et al. (2001). "Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities." Curr Biol **11**(24): 1903-13.

Conclusion et perspectives

Nous avons conçu un système de mesure de force dédié à la propulsion par polymérisation d'actine. Ce système nous a permis d'effectuer pour la première fois une mesure directe des forces générées lors de ce processus, ainsi que des vitesses qui lui sont associées. Cette méthode possède en outre l'avantage de pouvoir visualiser la croissance de la comète ce qui permet non seulement un contrôle de l'expérience mais aussi la mesure de paramètres géométriques. Enfin, l'arrachement et la croissance d'une nouvelle comète offrent la possibilité de faire un nombre conséquent de mesures (jusqu'à 25 effectuées) ce qui est très utile pour étudier les variations d'un paramètre dans des conditions contrôlées.

En imposant une vitesse élevée, nous avons sondé les propriétés statiques du système en mesurant le module élastique de la comète et la force d'adhésion entre le gel et les protéines activatrices.

A des vitesses plus faibles, nous avons reproduit et caractérisé l'instabilité dynamique de stick-slip déjà observée tant chez la *Listeria* que sur des billes recouvertes de VCA. La transition est observée en imposant une vitesse supérieure à la vitesse de croissance. Grâce à la mesure combinée de force et de vitesse, il est possible de mesurer l'hystérésis caractéristique de ce type d'instabilité. Ce résultat nous a amené à émettre l'hypothèse que les billes recouvertes de N-WASP et celles de VCA évoluent dans deux régimes de friction différents. On devrait alors trouver la même transition pour VCA mais en lui imposant une vitesse plus faible que sa vitesse de croissance. D'autre part, les billes N-WASp devraient produire un diagramme d'état dynamique inversé par rapport aux VCA : les petites billes à faible densité devraient osciller et les grosses billes devraient être continues.

Nous avons appliqué des forces constantes dans la gamme pertinente de la propulsion par polymérisation d'actine (quelques nanonewtons) aussi bien positives (contre le mouvement) que négatives (dans le sens du mouvement). Cela nous a permis de décrire la dynamique du système par son diagramme force vitesse. Le comportement de cette relation est expliqué par une analyse élastique indépendante des détails microscopiques. Elle permet de confirmer que :

- la persistance de la propulsion provient de l'équilibre entre des forces internes largement supérieures à la force visqueuse.

-
- Sa robustesse s'explique par l'accumulation d'énergie élastique dans l'épaisseur du gel qui compense l'effet d'une force extérieure s'opposant au mouvement.

On comprend alors comment les *Listeria* peuvent traverser la barrière cellulaire en maintenant leur vitesse et se disséminer dans les cellules adjacentes. La question qui se pose maintenant est comment peut-on comprendre la physique de la protrusion du pseudopode qui est le plus proche exemple physiologique. Sa topologie étant inversée, la composante majeure du mouvement par propulsion, la force élastique, n'est pas présente. L'analyse élastique n'est donc pas transposable à ce cas. Par contre, elle a permis de développer une approche mésoscopique des phénomènes cellulaires. Cette approche est essentielle pour pouvoir rationaliser les effets coopératifs qui interviennent dans la cellule ce qui n'est pas possible au travers de traitements purement microscopiques.

Maintenant que la relation force vitesse est établie pour des conditions standard et dans un système minimal, il est nécessaire de la réaliser dans les extraits cellulaires plus physiologiques. Cette expérience peut s'avérer être un outil quantitatif pour déterminer l'action d'autres protéines ou de drogues sur la propulsion. On peut par exemple modifier l'activateur pour étudier ses conséquences sur la propulsion ou mesurer l'action de protéines réticulant l'actine sur le mouvement ou sur les propriétés du gel. Enfin, si l'on veut concevoir des traitements spécifiquement ciblés sur la migration cellulaire lors de l'invasion des métastases il doivent déstabiliser cette migration sans la faire disparaître. Un tel système peut servir à quantifier l'effet de traitements potentiels sur la polymérisation.

Résumé

Les assemblages dynamiques d'actine sont à l'origine de forces intracellulaires présentes tant dans les processus physiologiques que pathologiques comme l'invasion tumorale. Pour s'échapper du foyer primaire, les cellules néoplasiques étendent une protrusion par polymérisation d'actine dirigée puis se contractent grâce à des câbles composés d'actine et de myosine. Dans une première partie, nous décrivons une étude préliminaire de la traction cellulaire effectuée par une expérience d'étirement uniaxial sur fibroblaste unique. Les forces générées par polymérisation d'actine font l'objet de la deuxième partie de ce travail. La bactérie *Listeria monocytogenes* et ses systèmes biomimétiques propulsés par polymérisation ont été largement utilisés comme modèles pour identifier les composants biochimiques de la polymérisation dirigée d'actine. Pourtant les forces générées et leurs origines font encore l'objet de controverses. Afin de mesurer directement ces forces, nous avons développé une expérience de micromanipulation sur des objets propulsés. Une comète croissant à partir d'une bille recouverte de protéine et fixée à un capteur de force est maintenue grâce à une micropipette. Nous appliquons à ce système des forces de traction ou de compression de plusieurs nanonewton. Une sollicitation rapide nous permet de mesurer le module d'élasticité de la comète et la force d'adhésion entre la comète et la bille. La relation force vitesse du système est déterminée, par l'application d'une force constante, et expliquée à partir d'une analyse élastique qui permet de comprendre la robustesse d'un tel mouvement. Enfin la transition vers une instabilité dynamique de type stick-slip est mise en évidence en variant la vitesse imposée au système.

Abstract

Dynamic actin networks dynamic generate intracellular forces in physiological processes as well as in pathologic phenomena like tumor invasion. To detach from the primary tumor and colonize surrounding tissues, neoplastic cells extend a protrusion by actin polymerization then exert a traction force, using actin bundles. In the first part of this manuscript, we focus on cell traction using a uniaxial strain experiment on single fibroblasts. The forces exerted by actin polymerization are studied in the second part. To directly probe the forces generated in the process of actin-based propulsion, we developed a micromanipulation experiment using biomimetic system of *Listeria monocytogenes*, a model of actin-based motility. By using specially designed flexible handles, a comet growing from a coated polystyrene bead is held between a micropipette and a force probe. This allows us to apply both pulling and pushing external forces up to a few nanonewtons. The elastic modulus of the comet and the adhesion force between the bead and the comet are inferred from fast pulling experiments. The force velocity relation is determined, by applying a constant force on the system, and explained using a dimensional elastic analysis. Finally, varying the pulling speed allows for the characterization of a transition to a regime of dynamic instability.