



HAL
open science

Propulsion par l'actine : Génération de force

Hakim Boukellal

► **To cite this version:**

Hakim Boukellal. Propulsion par l'actine : Génération de force. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT : . tel-00009387

HAL Id: tel-00009387

<https://theses.hal.science/tel-00009387>

Submitted on 6 Jun 2005

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Spécialité

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE ANALYTIQUE DE PARIS-CENTRE

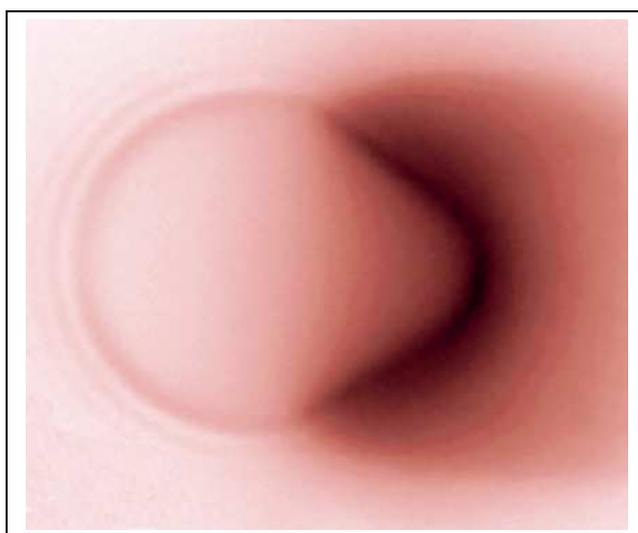
présentée par

Hakim BOUKELLAL

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Propulsion par l'actine : Génération de force



soutenue le 14 septembre 2004 devant le jury composé de :

M. Pierre BONGRAND rapporteur

Mme Anne-Marie CAZABAT

M. Jean-Marc Di MEGLIO rapporteur

M. Ken SEKIMOTO

Mme Cécile SYKES directeur de thèse

Je remercie,

Les membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail, merci à Pierre Bongrand et Jean-Marc Di Meglio pour avoir été les rapporteurs de ce travail.

Cécile Sykes pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse, une thèse qui fut l'occasion pour moi d'apprendre énormément tant sur le plan scientifique que sur moi même.

Jacques Prost pour ses grandes qualités scientifiques et humaines qui ont permis de faire du laboratoire de Physico-Chimie de l'Institut Curie un lieu de haut niveau de recherche avec une atmosphère des plus agréables.

Jean-François Joanny pour sa gentillesse et sa disponibilité pour répondre à toutes mes questions même les plus naïves.

Franck Jülicher qui fut le premier théoricien avec lequel j'ai collaboré et qui m'a donné le goût de ces échanges et de ces interactions nécessaires entre le monde des expériences et celui de la théorie.

Françoise Brochard pour m'avoir fait découvrir le monde de la matière molle et de l'interface entre la physique et la biologie dont j'ignorais la proximité.

Julie Plastino pour sa gentillesse et l'extrême patience dont elle a fait preuve à mon égard en répondant à toutes mes interrogations sur le monde de la biologie. Merci également d'avoir supporté que je chantonne pendant nos expériences ;0)

Les chercheurs et les étudiants de Curie, aussi bien les physiciens que les biologistes pour leur disponibilité et les discussions que nous avons eu.

Michel Petit et toute l'équipe de mécanique pour tous les services rendus.

Françoise Annotiau, Nicole Blandeau et Francine Verin pour leur efficacité au quotidien.

Patrick Suchet pour avoir résolu avec le sourire bon nombre de petits problèmes pratiques du quotidien.

Toute l'équipe du Cytogroupe passée et présente : Cécile Sykes, Vincent Noireaux, Roy Golsteyn, Julie Plastino, Anne Bernheim, Corinne Chevallard, Nathalie Jarroux, Yann Marcy, Ewa Paluch, Jasper Van Der Gucht, Léa Trichet, Matthieu Courtois...

Anne Bernheim, Corinne Chevallard, Adeline Giganti et Mathieu Poujade pour avoir partager le même bureau... et donc pour m'avoir supporté :0)

Xavier Noblin et Lorenzo Busoni pour l'aide qu'ils m'ont apporté lors de mes expériences de tension interfaciale.

Danijela Vignjevic pour les nombreux conseils sur la purification de la fascine.

Otger Campàs pour sa bonne humeur lors de nos discussions sur le modèle théorique des gouttes molles et l'aide qu'il m'a apporté.

Ken Sekimoto pour les discussions stimulantes que nous avons eu grâce à son regard neuf et pertinent. Merci pour ton amitié.

Mes amis de Chimie-Physique Manuel, Ignace, Sylvie, Jérémie, Lino, Rabbah, Philipppes, Vincent, Ingrid, Serge, Bruno, Yoann, ... pour leur bonne humeur et leur amitié.

L'Association pour la Recherche sur le Cancer qui a soutenue financièrement ma dernière année de thèse.

Mon Ange du Ciel pour son soutien quotidien.

Ma famille et mes amis.

Tvram adif... Arezeth ighess!!!
(Vous voulez la moelle..... Brisez l'os!!!)



(Si j'avais des cornes, je percerais le ciel.)
Amar sêar acheewen, athe floure ijennee.

Table des matières

I	Polymérisation de l'actine et motilité cellulaire	13
I.1	Introduction	15
I.1.1	Rôles et modes d'action de la polymérisation de l'actine dans la cellule	15
I.1.2	Motilité cellulaire	15
I.2	Polymérisation de l'actine	17
I.2.1	Actine monomérique et polymérisation <i>in vitro</i>	17
I.2.1.1	Généralités	17
I.2.1.2	Le monomère :	17
I.2.1.3	Polymérisation <i>in vitro</i>	18
I.2.2	Contrôle de la polymérisation de l'actine <i>in vivo</i>	21
I.2.2.1	Contrôle de la polymérisation des filaments individuels . . .	21
I.2.2.2	Contrôle de la superstructure	25
I.3	<i>Listeria monocytogenes</i> et systèmes biomimétiques	31
I.3.1	Présentation générale de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
I.3.2	<i>Listeria</i> comme modèle d'étude	32
I.3.3	Systèmes biomimétiques	34
I.3.3.1	Billes de latex	34
I.3.3.2	Milieu reconstitué	34
I.3.4	Etudes physiques	35
I.3.4.1	Cliquet thermique élastique et filaments attachés : Approche théorique [Mogilner, 2003]	35
I.3.4.2	Croissance d'un gel d'actine en symétrie sphérique : approche théorique et expérimentale	38
I.3.4.3	Modèle élastique pour le mouvement : Approche théorique [Gerbal, 2000]	44
I.3.4.4	Courbure et Brisure de symetrie	53

I.4	Conclusion	57
II	Croissance d'un gel d'actine et brisure de symétrie	59
II.1	Approche théorique à une dimension	61
II.1.1	Position du problème	61
II.1.2	Modèle des points de réticulation	64
II.1.2.1	Idées générales du modèle	64
II.1.2.2	Détail des équations	66
II.1.2.3	Conclusion du modèle	68
II.1.3	Modèle de diffusion des monomères d'actine	69
II.1.3.1	Idées générales du modèle	69
II.1.3.2	Détail des équations	70
II.1.3.3	Conclusion du modèle	72
II.2	Approche expérimentale	73
II.2.1	Protocole expérimental et observations	73
II.2.1.1	Préparation des échantillons	73
II.2.1.2	Observations	74
II.2.1.3	Conclusion	76
II.3	Modèle à deux dimensions	77
II.3.1	Présentation du modèle	77
II.3.1.1	Distribution des contraintes dans un gel symétrique	78
II.3.1.2	Concentration des contraintes latérales dans un gel d'épais- seur inhomogène	79
II.3.1.3	Couplage mécano-chimique : croissance et dissociation d'un gel sous contrainte	82
II.3.1.4	Instabilité et brisure de symétrie	83
II.3.2	Etudes des modes de Fourier et limitations expérimentales	84
II.3.3	Conclusion	85
II.4	Conclusion	86
III	Mouvement par l'actine d'un objet déformable	101
III.1	Présentation du sujet et position du problème	103
III.2	Expériences	106
III.2.1	Préparation des gouttes d'huile	106
III.2.2	Influence des extraits cellulaires	106

III.2.3	La protéine nucléatrice	107
III.2.3.1	Densité de greffage	107
III.2.3.2	Répartition de la protéine nucléatrice	109
III.3	Mesure de la tension interfaciale	111
III.3.1	Position du problème	111
III.3.2	Méthodes et mesures	112
III.3.2.1	Micropipettes	113
III.3.2.2	Goutte pendante et goutte montante	117
III.3.3	Conclusion	122
III.4	Déformation de vésicules lipidiques	124
III.4.1	Forces de compressions générées par une comète d'actine sur une vésicule lipidique [Giardini, 2003]	124
III.4.2	Mise en évidence des forces induites par polymérisation de l'actine sur une vésicule lipidique [Upadhyaya, 2003]	126
III.5	Observations expérimentales et modélisation	129
III.5.1	Etat stationnaire	129
III.5.2	Taille et déformation	130
III.6	Analyse élastique de la déformation	132
III.6.1	Présentation du modèle	132
III.6.1.1	Détermination de la forme	132
III.6.1.2	Force de propulsion et contraintes.	135
III.6.1.3	Améliorations à apporter au modèle	137
III.6.2	Influence de l'ajout de protéines réticulant l'actine sur la déformation	139
III.7	Conclusion	142

Introduction générale

Au cours de cette thèse, je me suis intéressé aux mécanismes de production de forces au sein de la cellule. Ces mécanismes interviennent en particulier lors du déplacement et de la multiplication des cellules. Toutes ces activités nécessitent de déformer la cellule pour qu'elle acquière une « polarité ». Sous la membrane plasmique siège ce que l'on nomme le « cytosquelette », organe essentiel au maintien de la forme de la cellule. L'actine, principal composant de ce système, est un biopolymère, capable tantôt de s'assembler en filament ou bien de retourner à l'état de monomère. Les filaments d'actine peuvent ensuite s'organiser pour former des structures tridimensionnelles très variées et adaptées aux fonctions mécaniques dont la cellule a besoin. Le contrôle de la dynamique locale de l'actine ainsi que de sa structure au niveau du cytosquelette permet à la cellule de contrôler sa forme. Ces mécanismes jouent également un rôle fondamental dans le mouvement cellulaire. Bien que très souvent associée à un moteur moléculaire pour générer une force, l'actine est capable, à elle seule par son assemblage, de produire une force suffisante pour déformer une membrane ou propulser un pathogène comme la bactérie *Listeria monocytogenes*.

La première partie rappelle les connaissances acquises ces quinze dernières années sur les propriétés générales de l'actine. J'ai mené l'étude de la propulsion et des forces mécaniques générées par la polymérisation de l'actine. D'une part j'ai analysé comment la croissance d'un gel d'actine conduit à une polarité et au mouvement (partie II), d'autre part j'ai caractérisé et décrit les contraintes exercées par le gel d'actine lors de la propulsion (partie III). Les cellules cancéreuses migrent de façon exagérée et anormale, indépendamment des voies de signalisation habituelle, ce qui favorise la formation de métastases. Le comportement inhabituel de l'actine dans ces cellules a été mis en évidence. Aussi, une meilleure compréhension des propriétés mécaniques des gels d'actine et des contraintes qu'ils peuvent produire permettra une meilleure approche pour l'étude des anomalies du mouvement chez une cellule.

Chapitre I

Polymérisation de l'actine et motilité cellulaire

Cette première partie présente l'état des connaissances actuelles sur les propriétés générales de l'actine. Elle permettra d'acquérir les bases nécessaires à une bonne compréhension de la suite du manuscrit.

Nous débuterons par la description des propriétés de polymérisation et dépolymérisation de l'actine *in vitro*. Nous verrons ensuite que *in vivo*, il existe un grand nombre de protéines interagissant avec l'actine pour réguler sa dynamique ainsi que son organisation dans l'espace. Nous décrirons ensuite les stratégies développées pour étudier comment les réseaux d'actine interviennent dans la dynamique cellulaire. Pour cela je présenterai la bactérie *Listeria monocytogenes* et nous comprendrons comment elle est devenue un système modèle pour ce type d'étude. Nous décrirons ensuite les systèmes artificiels qui se sont inspirés de *Listeria* et les avantages que cela présente pour l'étude des mécanismes utilisant la polymérisation de l'actine. Je finirai enfin cette première partie en exposant les différentes théories existantes pour l'interprétation des observations expérimentales du mouvement de *Listeria* ainsi que sur les systèmes biomimétiques. Ces théories, même si elles sont souvent imparfaites, permettent tout de même de faire une représentation des modes d'action de l'actine dans la cellule.

Le contenu de ce chapitre sera utilisé tout au long de la thèse. Il constitue les fondements des expériences et des raisonnements que nous avons menés par la suite.

Sommaire

I.1	Introduction	15
I.1.1	Rôles et modes d'action de la polymérisation de l'actine dans la cellule	15
I.1.2	Motilité cellulaire	15
I.2	Polymérisation de l'actine	17
I.2.1	Actine monomérique et polymérisation <i>in vitro</i>	17
I.2.2	Contrôle de la polymérisation de l'actine <i>in vivo</i>	21
I.3	<i>Listeria monocytogenes</i> et systèmes biomimétiques	31
I.3.1	Présentation générale de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
I.3.2	<i>Listeria</i> comme modèle d'étude	32
I.3.3	Systèmes biomimétiques	34
I.3.4	Etudes physiques	35
I.4	Conclusion	57

I.1 Introduction

I.1.1 Rôles et modes d'action de la polymérisation de l'actine dans la cellule

L'actine joue un rôle important dans de nombreux évènements biologiques fondamentaux. Son action s'exerce à travers sa capacité à polymériser et par les forces mécaniques que cela produit. Ainsi lors de la phagocytose (figure I.1 a), l'actine déforme la membrane de manière à envelopper l'objet à digérer. Un autre exemple est celui de la cytotédièrese, phase tardive de la mitose où il y a division du cytoplasme des deux cellules formées, au cours de cette étape l'actine forme alors un anneau contractile qui contribue à la séparation de ces deux cellules (figure I.1 b). Enfin, on peut citer une fonction essentielle de l'actine qui est celle du maintien de structures cellulaires spécifiques, comme cela est le cas par exemple de la structure en brosse des cellules intestinales, ainsi que pour les cellules ciliaires de l'oreille interne (figure I.1 c).

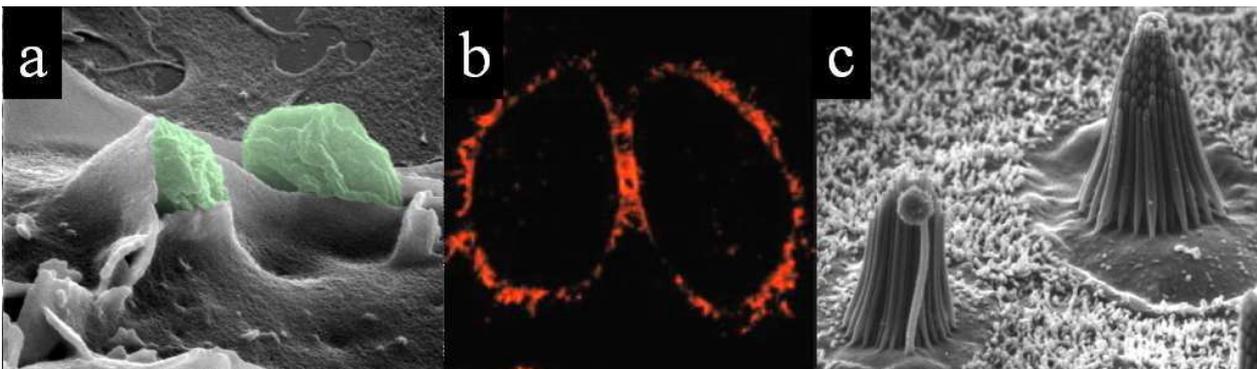


FIG. I.1: Différentes fonctions de l'actine : (a) phagocytose [Massol, 1998], (b) cercle contractile d'actine lors de la cytotédièrese [Eda, 2001], (c) Stéréocil [Holt, 2000]

Dans ces divers mécanismes, l'actine agit rarement seule, elle est notamment souvent associée à des myosines qui sont des moteurs moléculaires qui interagissent avec les filaments d'actine pour générer des forces contractiles. C'est le cas par exemple au sein de nos muscles.

I.1.2 Motilité cellulaire

L'un des aspects les plus importants de l'actine est le rôle qu'elle joue dans la gestion de la morphogénèse de la cellule et notamment lors de la motilité cellulaire, ce que nous avons étudié ici. Il existe, au niveau de la membrane plasmique, des protéines qui ont pour

fonction d'initier la polymérisation de l'actine en orientant tous les filaments dans le même sens [Machesky, 1998]. Cette polymérisation localisée "polarise" la cellule et crée un front de migration dans le sens de déplacement de la cellule (figure I.2).

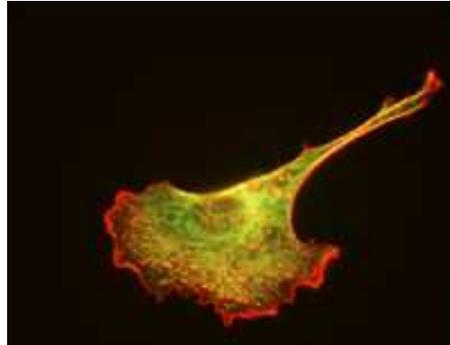


FIG. I.2: Fibroblaste en mouvement. Double marquage actine/myosine, l'actine en rouge apparaît très présente au front de migration de la cellule [Chisholm]

L'actine polymérise à l'avant et dépolymérise à l'arrière du front de migration, la cellule recycle ainsi l'actine afin d'avoir constamment des monomères disponibles pour la polymérisation. De nombreuses équipes s'intéressent aux mécanismes liés à l'actine, car les cellules cancéreuses ont entre autre leur machinerie d'actine fortement perturbée. On observe en effet que les cellules cancéreuses se déplacent plus et qu'elles sont capables de passer à travers certains tissus qu'une cellule saine ne peut pas franchir. Ces changements se font conjointement avec les modifications d'expression des protéines régulatrices associées à l'actine [Jordan, 1998]; c'est en effet à travers une surexpression ou une sous-expression de certaines de ces protéines que s'opèrent les modifications des propriétés de l'actine. Il en découle des bouleversements dans la dynamique des filaments d'actine, ce qui influe fortement sur les propriétés mécaniques et de déplacement des cellules tumorales. En effet, ces cellules présentent une motilité beaucoup plus importante que celle d'une cellule saine. Ce dérèglement du cytosquelette d'actine joue un rôle fondamental dans certaines étapes de la migration de ces cellules cancéreuses depuis leur foyer d'origine jusqu'aux foyers secondaires, favorisant l'apparition de métastases.

I.2 Polymérisation de l'actine

I.2.1 Actine monomérique et polymérisation *in vitro*

I.2.1.1 Généralités

L'actine est une protéine très conservée à travers les espèces (qu'elles soient animales ou végétales) [Sheterline, 1994]. Cette protéine globulaire (Actine-G) de 42 kDa, qui est constituée de 375 acides aminés, fut identifiée pour la première fois par Straub en 1942 comme étant une partie du complexe acto-myosine responsable de la génération de forces contractiles dans les muscles [Straub, 1942]. L'actine est une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes et représente 5 à 10% de la masse protéique des cellules (jusqu'à 20% pour les cellules musculaires dont elle est généralement extraite pour la réalisation d'expériences *in vitro*). Dans les cellules non musculaires, l'actine est très présente près de la surface de la cellule où elle forme le cortex d'actine qui constitue une partie du cytosquelette de la cellule. Ce cortex permet à la cellule d'avoir une résistance mécanique et joue (notamment par sa réorganisation locale) un rôle fondamental dans les mécanismes de motilité cellulaire. Chez l'homme, différents gènes codent pour six types d'actine qui ne varient entre eux que de quelques acides aminés. Les différentes formes sont rangées en trois classes α , β et γ caractérisées par leur point isoélectrique (de 5.4 pour α à 5.9 pour γ) [Zechel, 1978]. Les différentes classes d'actine humaine polymérisent de la même façon *in vitro* et forment des copolymères entre eux. Il existe cependant de petites différences dans la structure des filaments et des différences plus importantes dans la capacité de certaines protéines à se fixer suivant l'isoforme de l'actine [Segura, 1984]. *In vivo*, les différentes formes d'actine coexistent dans la cellule mais elles sont différemment régulées et très souvent ne peuvent pas se substituer dans leurs fonctions respectives [Kumar, 1997 ; Chaponnier, 1995]. La polymérisation de l'actine est un processus qui consomme de l'ATP (Adenosine Triphosphate) qui est le « carburant » de la cellule. Le monomère polymérise sous la forme actine-ATP, puis l'ATP est hydrolysée en ADP dans le filament.

I.2.1.2 Le monomère :

La structure d'un monomère d'actine associé avec un ADP est donnée figure I.3.

Le monomère d'actine se replie en deux lobes, le petit et le grand domaine, eux-mêmes divisés en deux sous domaines. La jonction des quatre sous domaines forme un interstice dans lequel réside un complexe métal-nucléotide constitué de K^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} pour le métal et d'ATP ou ADP pour le nucléotide. En effet, l'actine est une ATPase qui catalyse

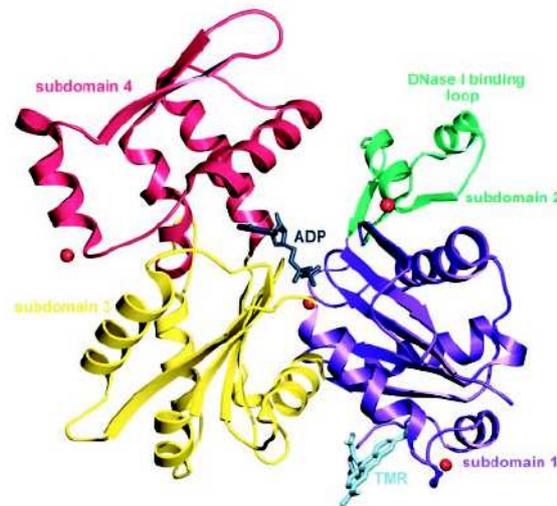


FIG. I.3: Représentation d'un monomère d'actine-ADP. Les quatre sous domaines sont mis en évidence ainsi que l'ADP qui est lié au centre de la molécule là où les quatre domaines se rencontrent [Otterbein, 2001]

l'hydrolyse de l'ATP en ADP.

Bien que les structures de l'actine-ATP et de l'actine-ADP soient très proches, la nature du nucléotide influe significativement sur les propriétés biochimiques du filament d'actine et plus particulièrement sur les mécanismes de polymérisation/dépolymérisation comme nous le verrons par la suite.

I.2.1.3 Polymérisation *in vitro*

A très faible force ionique, l'actine se met sous forme globulaire (dite actine-G) ; il en va de même à très forte concentration en sel. A force ionique physiologique (KCl 0.1 M), les monomères d'actine s'assemblent spontanément en filaments (dit actine-F) et adoptent un arrangement hélicoïdal d'une demi-période de 37nm (figure I.4).

Le mécanisme de « nucléation-élongation » de l'assemblage de l'actine a été élucidé par Oosawa [Oosawa, 1962] et le modèle cinétique par Wegner et Engel [Wegner et Engel, 1975] On distingue quatre étapes principales lors de la polymérisation :

-L'activation : les monomères se lient à un cation Ca^{2+} , Mg^{2+} ou K^{+} écrantant ainsi la charge négative de la protéine et induisant un changement conformationnel.

-La nucléation : C'est l'étape cinétiquement limitante. Le taux de nucléation est proportionnel au cube de la concentration en actine-G, suggérant la nécessité de la formation d'un trimère de molécules d'actine avant d'avoir une élongation spontanée du filament. Or la for-

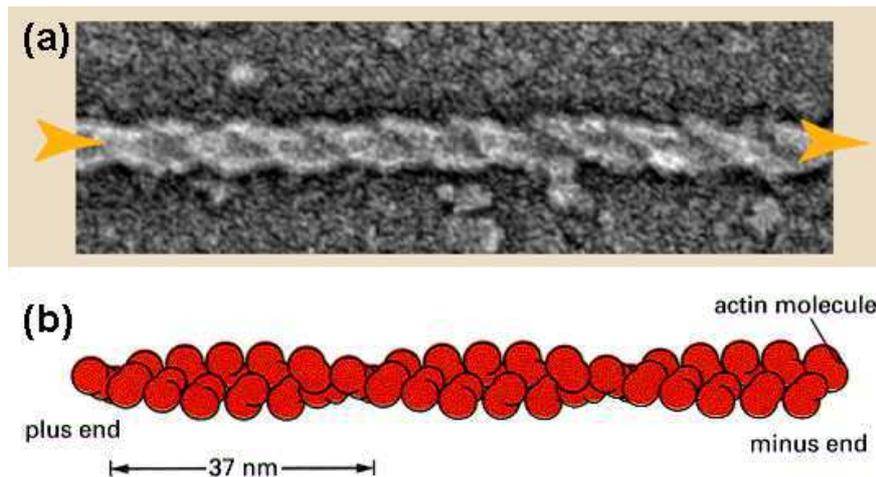


FIG. I.4: structure d'un filament d'actine. (a) Filament d'actine décoré avec des fragments S1 de myosine II vu en microscopie électronique [Machesky, 1998]. (b) Schéma de la structure en hélice d'un filament d'actine [Alberts, 1994]

mation d'un trimère nécessite la formation préalable d'un dimère qui dans le cas de l'actine est fortement instable.

-La croissance : c'est une phase de croissance rapide du filament qui se termine par un plateau.

L'actine-G est une protéine asymétrique, cette asymétrie du monomère rend les filaments formés également asymétriques. On distingue ainsi les deux extrémités en parlant du « bout moins » (dit aussi bout pointu) où l'actine polymérise plus lentement et du « bout plus » (ou bout barbé) où la croissance du filament est rapide.

Les liaisons entre monomères dans le filament sont des liaisons faibles. L'actine polymérisée constitue donc une chaîne dynamique constamment en équilibre avec la forme monomérique présente en solution. Pour une extrémité donnée du filament, le taux d'association (nombre de monomères qui s'ajoutent par unité de temps) est proportionnel à la concentration C en actine-G du milieu. Au court du temps, les monomères sont consommés et la concentration en sous unités libres diminue jusqu'à atteindre une valeur critique C_c pour laquelle à chaque instant la dépolymérisation équilibre la polymérisation et le filament arrête de croître. Dans les conditions habituellement rencontrées dans la cellule, c'est à dire notamment en présence d'ATP et à force ionique physiologique, ce sont des monomères d'actine-G-ATP qui vont préférentiellement polymériser. Une fois dans le filament, il va tout d'abord y avoir clivage de l'ATP en ADP-Pi puis relargage du phosphate dans un deuxième temps. Ce processus est relativement lent, ainsi au bout barbé où la croissance est rapide, il

peut se former une coiffe d'actine-ATP [Carlier, 1984]. On se retrouve alors avec des formes différentes d'actine aux deux extrémités du filament : Actine-ATP au bout plus, Actine-ADP au bout moins et de l'Actine-ADP-Pi au centre [Carlier, 1986 et 1991] (figure I.5).

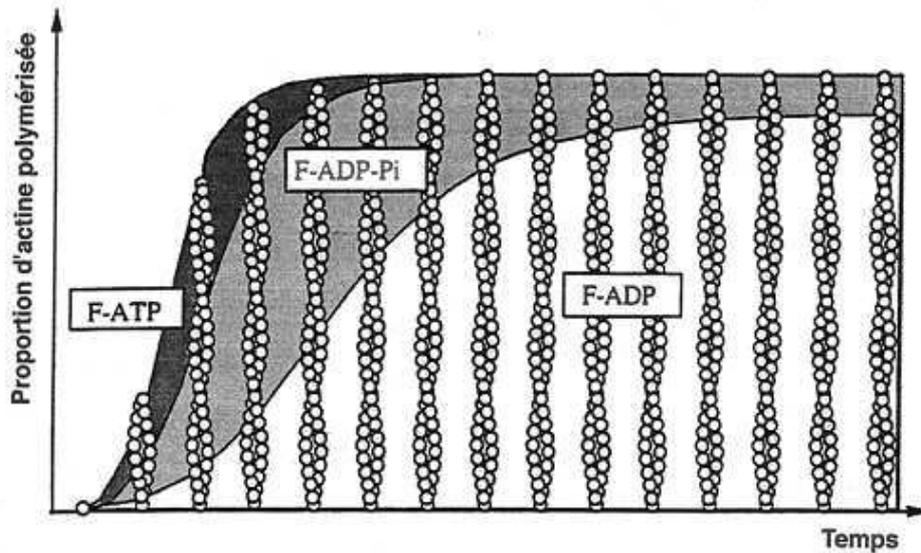


FIG. I.5: Composition d'un filament d'actine au cours de sa polymérisation [Carlier, 1991]

Dès lors, la nature de la liaison brisée lors de la dépolymérisation est différente à chacune des extrémités du filament. Cela a pour effet de déplacer les états d'équilibre des deux extrémités et impose d'avoir des concentrations critiques en actine différentes au bout pointu et au bout barbé. Or, l'hydrolyse de l'ATP diminue l'affinité du monomère pour ses voisins, ce qui favorise la dépolymérisation. On se retrouve donc avec une concentration critique au bout pointu supérieure à celle du bout barbé. Cet événement est la conséquence la plus importante de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, comme on a $C_c(\text{pointu}) > C_c(\text{barbé})$, la croissance du filament va se faire jusqu'à une concentration en actine-G qui sera supérieure à $C_c(\text{barbé})$ et inférieure à $C_c(\text{pointu})$. Ce qui signifie qu'à ce stade, **la cinétique du bout plus est dominée par l'ajout de monomères alors qu'au bout moins les monomères se détachent. On a donc un mécanisme dit de « tapis roulant » ou « treadmilling » où la longueur du filament reste constante avec addition de sous unités au bout barbé et dissociation au bout pointu** (figure I.6).

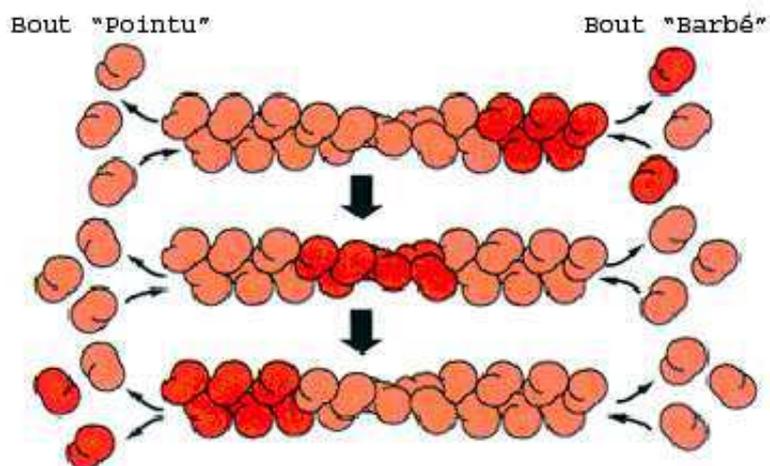


FIG. I.6: Représentation du "treadmilling" où les monomères en rouge, incorporés au bout barbé, avancent le long du filament au court du temps [Alberts, 1994].

I.2.2 Contrôle de la polymérisation de l'actine *in vivo*

On vient de voir les mécanismes de polymérisation de l'actine *in vitro*. Il s'avère que *in vivo*, les cinétiques de l'actine et notamment du treadmilling sont très différentes et peuvent être supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles observées *in vitro*. Ce phénomène est dû à l'action de protéines régulatrices de la cellule que nous présentons ici.

In vivo, la polymérisation de l'actine contrôle d'importants événements cellulaires et doit donc être régulée dans l'espace et dans le temps. Certains événements nécessitent des changements très localisés (comme lors de la formation de filopodes), alors que d'autres engendrent des restructurations plus importantes du cytosquelette d'actine comme c'est le cas par exemple pour la formation du lamellipode lorsque la cellule se met en mouvement. Dans tous les cas, ces différents processus sont orchestrés par des protéines liant l'actine, appelées ABPs (Actin Binding Proteins). Leur action se fait selon différentes voies et à différentes échelles, que se soit au niveau du monomère unique ou dans l'organisation des filaments en une structure tridimensionnelle.

I.2.2.1 Contrôle de la polymérisation des filaments individuels

Dans les cellules, la concentration en actine monomérique (20 à 500 μM) est largement supérieure à la concentration critique de l'actine pure (inférieure au micromolaire), l'actine devrait donc constamment polymériser, or cela n'est pas le cas. Ceci s'explique par la présence de protéines qui se lient au monomère d'actine-G pour l'empêcher de polymériser (figure I.7

), ainsi que de protéines qui vont se lier aux extrémités des filaments également dans le but de contrôler la taille des filaments.

Protéines liant le monomère

Différentes stratégies sont mises en œuvre pour séquestrer les monomères d'actine et ainsi contrôler la concentration en actine-G polymérisable dans le milieu. Cela régule le taux de croissance des filaments et par voie de conséquence la vitesse de formation des réseaux d'actine (figure I.7).

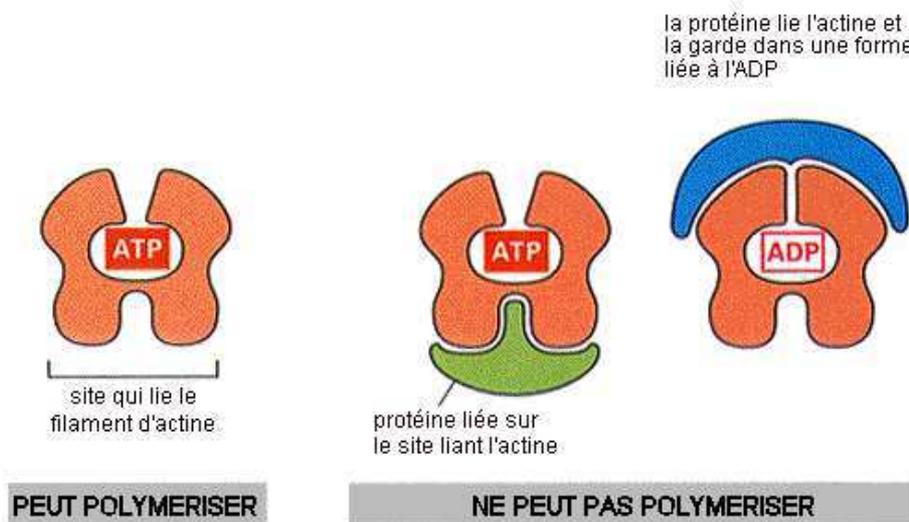


FIG. I.7: Deux mécanismes possibles par lesquels une protéine liant le monomère d'actine peut inhiber la polymérisation de l'actine [Alberts, 1994]

Voici deux exemples de protéines, la profiline et la thymosine β 4 qui interagissent de différentes manières avec le monomère d'actine : La **profiline** se lie préférentiellement aux monomères actine-ADP et favorise l'échange ADP/ATP [Theriot, 1994]. Le complexe actine-G-ATP-Profiline peut néanmoins polymériser mais uniquement au bout barbé [Pantaloni, 1993]. Cette particularité lui permet de jouer un rôle différent suivant les circonstances : lorsque tous les bouts barbés sont occupés par des protéines dites coiffantes, la profiline se comporte comme une protéine séquestrante alors que lorsque des bouts barbés sont libres, elle permet d'augmenter la quantité d'actine-G accessible aux bouts barbés et donc d'en augmenter la vitesse de polymérisation.

De même, la **thymosine β 4** a une forte affinité pour les monomères d'actine-ATP, elle a pour effet de séquestrer les monomères et de tamponner la quantité d'actine-G polymérisable

[Marchand, 1995]. Il est cependant important de souligner le fait que toutes ces protéines qui interagissent avec l'actine remplissent très souvent plusieurs fonctions et leur action peut varier suivant les paramètres extérieurs tels que leur concentration ou le pH du milieu par exemple. Ainsi la thymosine β 4 interagit avec l'actine-F lorsqu'elle est à forte concentration

Action sur les filaments

Différentes familles de protéines telles que la super famille gelsoline ou la famille des CapZ sont dites « protéines coiffantes ». Elles ont pour propriété de se lier à une extrémité du filament (d'où le terme « coiffante ») afin d'empêcher l'addition ou la dissociation de sous unités. A ce jour, la majorité des protéines coiffantes identifiées ont une action au niveau du bout barbé.

La **gelsoline** est une protéine régulée par le calcium qui va activer le coiffage et/ou la fragmentation des filaments. Une fois le filament coiffé au bout barbé, il aura tendance à se raccourcir en dépolymérisant au bout pointu. La quantité d'actine-G libre s'en trouve accrue, augmentant ainsi le treadmilling des filaments dont le bout barbé est libre. Ce raisonnement est général et s'applique à toutes les protéines coiffantes (figure I.8) [Carlier, 1997].

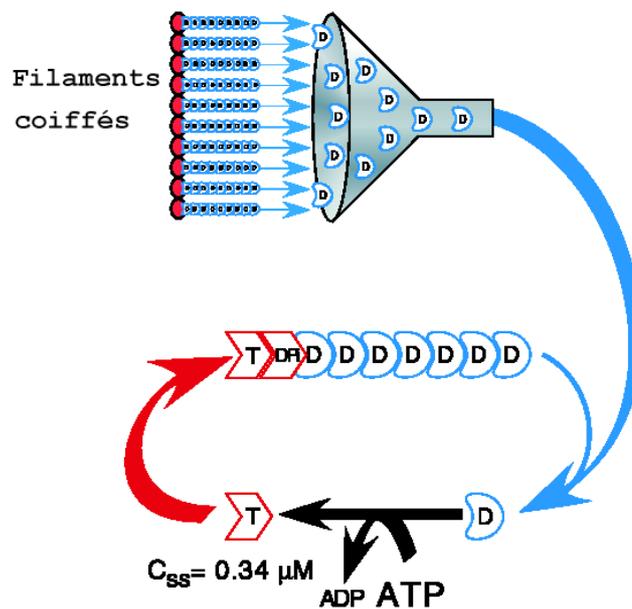


FIG. I.8: Effet des protéines coiffantes : Accélération de la polymérisation au bout barbé des filaments non coiffés [Pantaloni, 2001]

L'**ADF**(Actin Depolymerizing Factor)/**cofiline** se lie à l'actine-G ou F préférentiellement sous leur forme ADP. En se liant au filament, elle a pour effet d'en changer la conforma-

tion en modifiant d'environ 25% le pas de l'hélice (figure I.9)[McGough, 1997 et 1998]. En fragilisant la liaison entre monomères au sein du filament, l'ADF a pour effet d'augmenter significativement la vitesse de dissociation aux bouts pointus des complexes formés par l'ADF et l'actine-G-ADP [Carlier, 1997]. Enfin, elle accélère également le changement du nucléotide de l'ADP en ATP. Il en résulte une augmentation d'environ un facteur trois de la concentration en actine-G-ATP libre à l'état stationnaire ainsi qu'une accélération du treadmilling [Carlier, 1997].

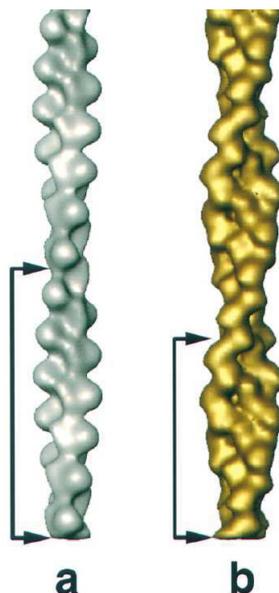


FIG. I.9: Mise en évidence de l'influence de la cofiline sur le pas de l'hélice d'un filament d'actine par reconstruction 3D : (a) filament d'actine seul, (b) filament d'actine complexé avec la cofiline [McGough, 1997]

Un autre mode de régulation par l'ADF/cofiline se trouve être la conséquence du changement de conformation que subit le filament lors de l'accrochage de la protéine. En effet, des études ont montré que la liaison de l'ADF/cofiline avec le filament entre en compétition avec la liaison de la phalloïdine. Pourtant, comme on peut le voir sur la figure I.10, les sites de liaison à l'actine de ces deux protéines sont relativement éloignés. La compétition entre ces deux protéines n'est donc pas le fruit d'une interaction directe mais le résultat de l'altération du site de fixation à la phalloïdine qui survient lors du changement de géométrie du filament induit par l'ADF/cofiline. On peut noter également que de nombreuses protéines qui lient l'actine-F nécessitent d'être en contact avec deux monomères consécutifs du filament, ce qui les rend d'autant plus sensibles à la géométrie du filament [McGough, 1998].

Chaque protéine liant l'actine possède des sites de liaisons spécifiques sur le monomère

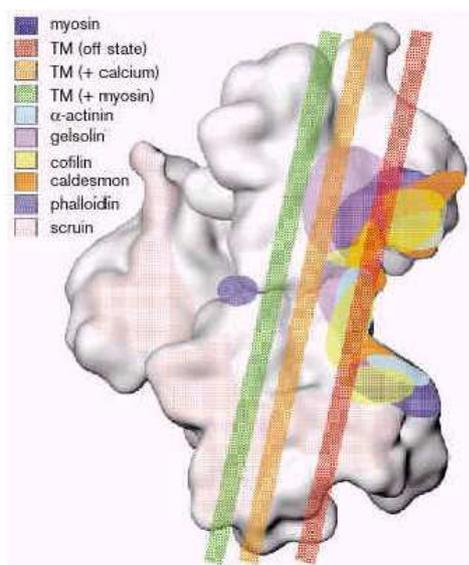


FIG. I.10: Sites de liaisons sur le filament d'actine [McGough, 1998]

(figure I.10). En déterminant les sites de liaison à l'actine accessibles, la conformation du filament exerce un contrôle sélectif sur les protéines qui vont pouvoir interagir avec le filament. Par ce biais, la géométrie du filament peut influencer non seulement sur les cinétiques de polymérisation du filament mais également sur la structure tridimensionnelle du réseau d'actine (car il est lui-même contrôlé par des ABPs). Bien qu'il soit soupçonné comme jouant un rôle dans certains mécanismes, ce contrôle par la géométrie du filament d'actine est un effet difficilement mis en évidence et reste à démontrer dans de nombreux cas.

I.2.2.2 Contrôle de la superstructure

Les protéines vues précédemment agissaient au niveau des monomères d'actine ou d'un filament, régulant ainsi essentiellement la cinétique de polymérisation de l'actine. Il existe des protéines qui travaillent à une échelle de taille supérieure. Elles sont responsables de l'arrangement dans l'espace des filaments d'actine entre eux. En effet, on observe dans une cellule un nombre important d'organisations très différentes de l'actine, ce qui confère notamment à ces structures des propriétés mécaniques particulières adaptées aux fonctions qu'elles doivent remplir. On trouve par exemple des faisceaux de filaments tous parallèles et orientés dans le même sens dans les microspicules et les filopodes, ou des gels réticulés au niveau du cortex cellulaire (figure I.11).

La présence sur l'espace relativement restreint que représente la cellule de nombreuses

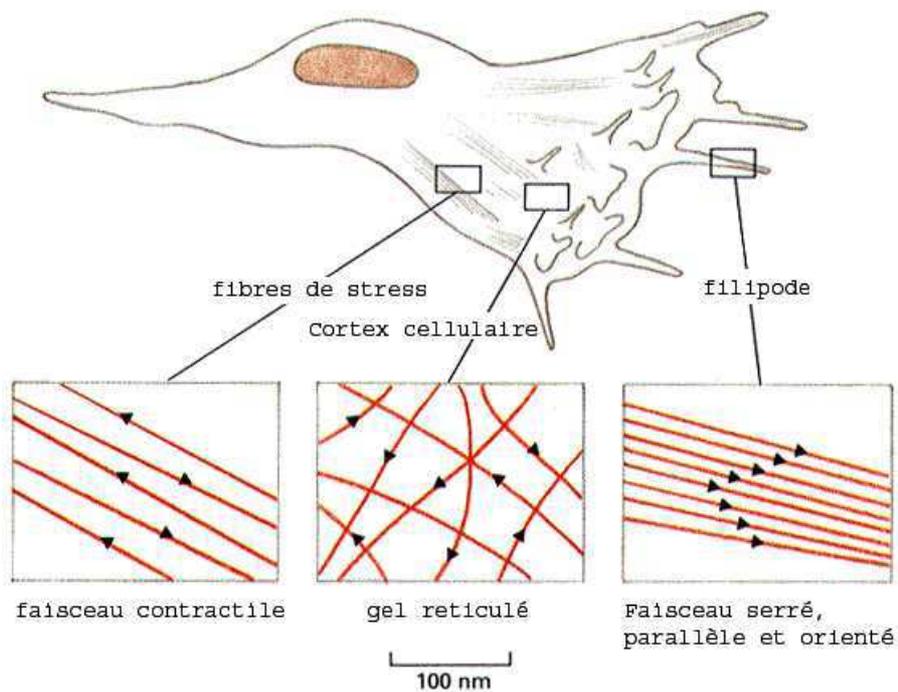


FIG. I.11: Représentation de différents arrangements de l'actine dans une cellule en mouvement [Alberts, 1994]

organisations différentes de l'actine implique l'existence d'une régulation supplémentaire au sein de la cellule. Cette question reste encore très largement sans réponse, les signaux transmembranaire qui activent la polymérisation de l'actine aux bords de la cellule constituent certainement un début de réponse (au moins dans certains cas). Nous allons nous intéresser ici au cas de quelques molécules parmi les plus connues pour organiser les filaments.

Architecture et fonction

La fimbrine comme l' α -actinine sont toutes deux des protéines réticulant les filaments d'actine en les organisant en faisceau. L' α -actinine se retrouve notamment dans les fibres de stress et les anneaux contractiles des cellules en division : les filaments d'actine sont parallèles entre eux, mais pas tous orientés dans la même direction et la structure formée est suffisamment lâche pour permettre aux myosines d'interagir avec l'actine pour créer des forces de contraction. *A contrario*, la fimbrine arrange parallèlement les filaments de façon très resserrée et tous orientés dans le même sens. Aussi, retrouve-t-on une telle organisation au bord avant des cellules dans les filopodes où tous les filaments sont orientés avec leur bout barbé dirigé vers la membrane plasmique (figure I.12).

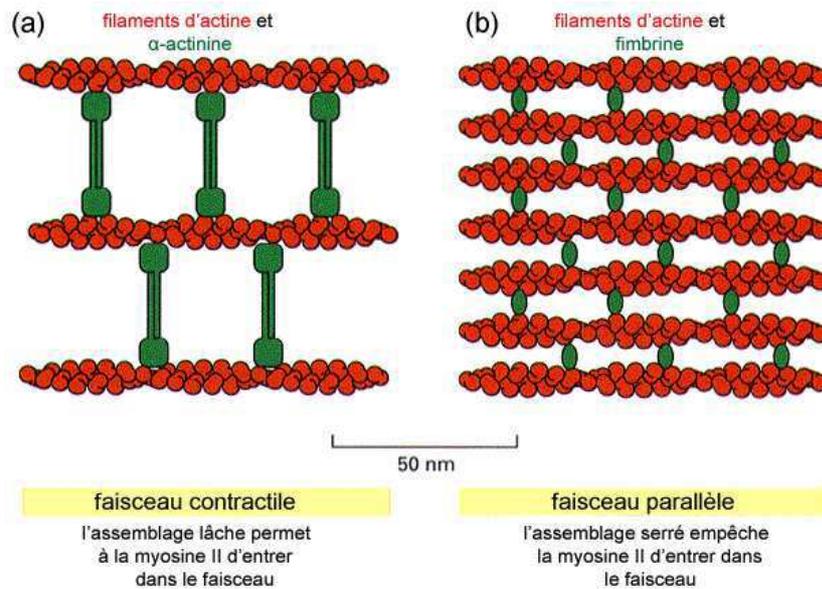


FIG. I.12: (a) l' α -actinine pontre les filaments en faisceaux lâche permettant l'insertion de la myosine II, (b) la fimbrine forme des faisceaux serré empêchant ainsi l'action de la myosine II [Alberts, 1994].

La présence d' α -actinine exclut la présence de fimbrine et réciproquement. Ces deux structures, qui au premier abord peuvent paraître relativement proches, se trouvent être très différentes et remplissent des fonctions spécifiques.

Filamine, α -actinine et tropomyosine : Coopération et compétition entre ABPs

La **filamine** est une protéine connue pour favoriser la formation de gel d'actine réticulé lâche où les filaments ont encore une assez grande liberté de mouvement. La **tropomyosine** quant à elle est une protéine qui se lie tout au long du filament d'actine et a pour effet de le stabiliser et de le rigidifier (la longueur de persistance L_p ¹ qui caractérise la rigidité du filament s'en trouve augmentée : passant d'environ $15\mu\text{m}$ habituellement à $20\mu\text{m}$ en présence de tropomyosine) (figure I.13).

Certaines protéines peuvent favoriser des structures tridimensionnelles au détriment d'autres. Ainsi, la tropomyosine, qui agit au niveau du filament unique, a une action qui va au-delà :

¹Le long d'une chaîne de polymère, l'interaction qui existe entre deux monomères successifs induit une corrélation entre leurs orientations respectives. La longueur de persistance L_p représente la distance telle que les orientations de deux monomères distant de L_p le long du filament soient décorélées. Elle traduit donc la longueur, mesurée le long du contour du polymère, dont il faut se déplacer pour que, en moyenne, l'orientation locale du polymère (définie par l'orientation de la tangente au contour en un point) a « oublié » son orientation initiale.

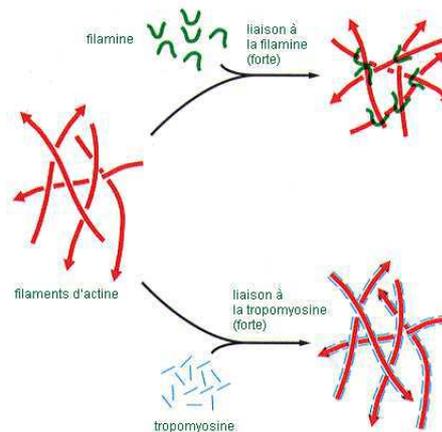


FIG. I.13: Différentes structurations des filaments d'actine par la filamine et la tropomyosine [Alberts, 1994]

elle favorise le pontage entre filaments par l' α -actinine en empêchant l'accrochage de la filamine. Par ce biais, elle favorise la formation de faisceaux contractiles. Cet exemple illustre un phénomène plus général, les différentes morphologies de l'actine observées (lamellipodes, filopodes, fibres de stress...) sont le résultat de ce type de mécanisme où interviennent en collaboration des ABPs agissant à toutes les échelles du monomère jusqu'au réseau tridimensionnel.

Le complexe Arp2/3

Arp2/3 (Actin Related Proteins) est un complexe de sept protéines constitué de Arp2, Arp3 ainsi que de cinq autres sous unités. Ce complexe a été identifié comme un acteur majeur dans les mécanismes de motilité reposant sur la polymérisation de l'actine. On le retrouve aussi bien dans le lamellipode des cellules en mouvement que dans la comète d'actine de pathogènes du type *Listeria* ou *Shigella* [Svitkina, 1999; Welch, 1998]. A ce titre, il fait aujourd'hui encore l'objet de nombreuses études et le mécanisme précis par lequel il agit reste le sujet de débats.

On trouve Arp2/3 aux points de jonction des filaments d'actine. Il a été montré, dans un premier temps *in vitro* [Mullins, 1998] puis cela a été confirmé *in vivo*, qu'Arp2/3 branche les filaments en formant un angle d'environ 70° [Svitkina, 1999] (figure I.14). De plus, le branchement par Arp2/3 se fait par le bout pointu des filaments, laissant ainsi l'extrémité barbue orientée vers la paroi et libre de croître pour participer à la locomotion. La génération d'un réseau dendritique par ce mécanisme permet de constamment multiplier le nombre de

filaments participant à la génération de la force de propulsion [Blanchoin, 2000].

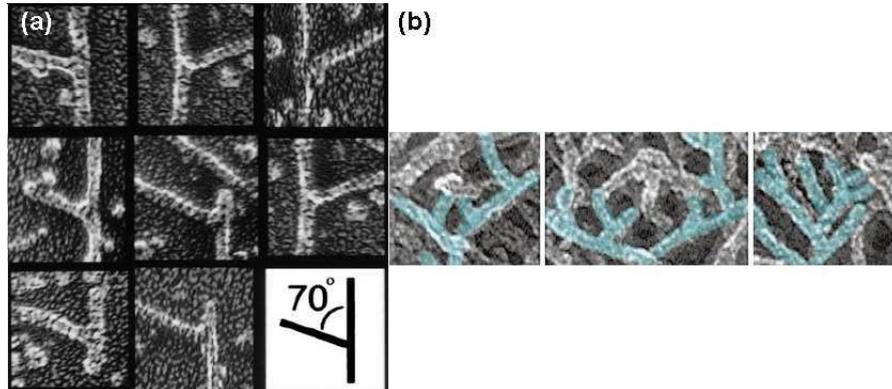


FIG. I.14: Arp2/3 branche les filaments d'actine en formant un angle de 70° . (a) image de microscopie électronique de filaments d'actine ayant polymérisé *in vitro* en présence d'Arp2/3 [Mullins, 1998], (b) Microscopie électronique du lamellipode d'un keratocyte de Xenope mettent en évidence le branchement à 70° des filaments [Svitkina, 1999].

Arp2/3 est activé par d'autres protéines de la cellule. Les protéines de la famille WASP/Scar sont les principaux « activateurs » d'Arp2/3 [Rohatgi, 1999 ; Higgs, 2001 ; Machesky, 1998]. Ces protéines se retrouvent dans toute la cellule mais sous forme repliée, leur conformation dépend de leur activation par d'autres protéines, de sorte que le site de liaison à Arp2/3 n'est pas toujours accessible. Ce mécanisme d'activation permet une action à des emplacements ciblés. Ainsi, sous l'action de signaux extracellulaires, des protéines transmembranaires vont recruter la protéine cdc42 qui va ensuite activer N-WASP, ensuite Arp2/3 est activé par liaison à N-WASP (figure I.15).

Le domaine C-terminal « VCA » de WASP a été identifié comme étant suffisant pour activer Arp2/3, la séquence VCA a d'ailleurs été retrouvée chez ActA de *Listeria* [Welch, 1998 ; Boujemaa, 2001]. VCA se lie à un monomère d'actine puis se lie à Arp2/3, le complexe ainsi formé interagit avec un filament « père » avant d'initier la formation d'un filament « fils ». La question de savoir comment Arp2/3 activé interagit avec un filament pour initier un branchement est encore sujet de controverse entre plusieurs équipes. Les uns pensent qu'Arp2/3 induit le branchement depuis le bout barbé du filament entrain de croître, générant ainsi une arborescence fractale [Pantaloni, 2000 ; Boujemaa, 2001]. Les autres pensent que le complexe actin-G-VCA-Arp2/3 se lie sur le côté de filaments préexistants [Amann, 2001]. Certains arguments, notamment le fait que statistiquement les filaments fils et père ont la même taille, semblent être en faveur d'un mécanisme autocatalytique.

Comme nous le verrons par la suite, dans les expériences menées au court de ma thèse,

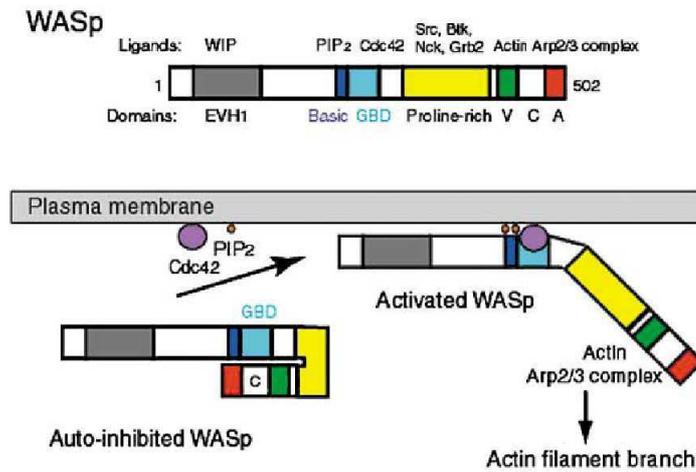


FIG. I.15: Mécanisme d'activation d'Arp2/3 par WASP [Pollard et Borisy 2003]

j'ai utilisé soit la protéine VCA, soit WA (qui possède le fragment VCA). Arp2/3 a donc forcément été un des acteurs de l'arrangement des réseaux d'actine dans mes expériences.

I.3 *Listeria monocytogenes* et systèmes biomimétiques

Pour étudier les mécanismes de polymérisation de l'actine, de nombreuses équipes ont eu recours à des systèmes modèles. La bactérie *Listeria monocytogenes* fut le premier de ces modèles, suivi quelques années plus tard par des systèmes totalement artificiels. Ces systèmes qui imitent la *Listeria* ont été mis au point afin de pouvoir faire varier de façon plus systématique les différents paramètres du système. Ce chapitre présente les principales études expérimentales et théoriques menées à ce jour. La vision mésoscopique du gel d'actine développée au laboratoire est ici décrite en détail. C'est dans le cadre de cette description élastique des réseaux d'actine que les expériences faites au cours de ma thèse ont été interprétées.

I.3.1 Présentation générale de *Listeria monocytogenes*

La bactérie *Listeria monocytogenes* est un bacille à Gram positif qui utilise l'énergie de la polymérisation de l'actine pour se propulser à travers les tissus qu'elle infecte. Des monomères d'actine viennent s'ajouter à la surface de la bactérie pour polymériser, poussant ainsi sur sa comète d'actine déjà formée, ce qui fait avancer la bactérie. Nous avons vu dans de nombreux cas (notamment les muscles), que pour produire la force requise au mouvement, l'actine est associée à la myosine. Cependant, la présence de moteurs tels que la myosine n'est pas nécessaire, dans le cas de pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* ou *Shigella Flexneri*, pour produire le déplacement [Mounier, 1990; Marchand, 1995; Southwick, 1998; Loisel, 1999]. Le processus de polymérisation est donc capable à lui seul d'induire le mouvement. Pour se déplacer dans le cytoplasme des cellules, ainsi que pour passer de cellule en cellule en traversant les membranes plasmiques, *Listeria* induit l'assemblage d'une comète d'actine. Cette comète est un réseau fait de filaments d'actine interconnectés entre eux et qui forment une structure tubulaire [Tilney, 1992] (figure I.16).

L'actine utilisée est recrutée dans le cytoplasme de la cellule hôte. La comète formée constitue un appui pour la *Listeria* de sorte que lors de l'ajout d'un nouveau monomère entre la surface de la bactérie et le gel anciennement formé, la bactérie est propulsée vers l'avant [Theriot, 1992].

Chez *Listeria*, la seule présence de la protéine transmembranaire ActA à la surface de la bactérie a été montrée comme étant nécessaire et suffisante pour déclencher la polymérisation de l'actine et ainsi induire le mouvement [Kocks, 1992; Smith, 1995]. Toutes les autres protéines nécessaires telles que l'actine, les cross-linkers (type α -actinine), le complexe Arp2/3,

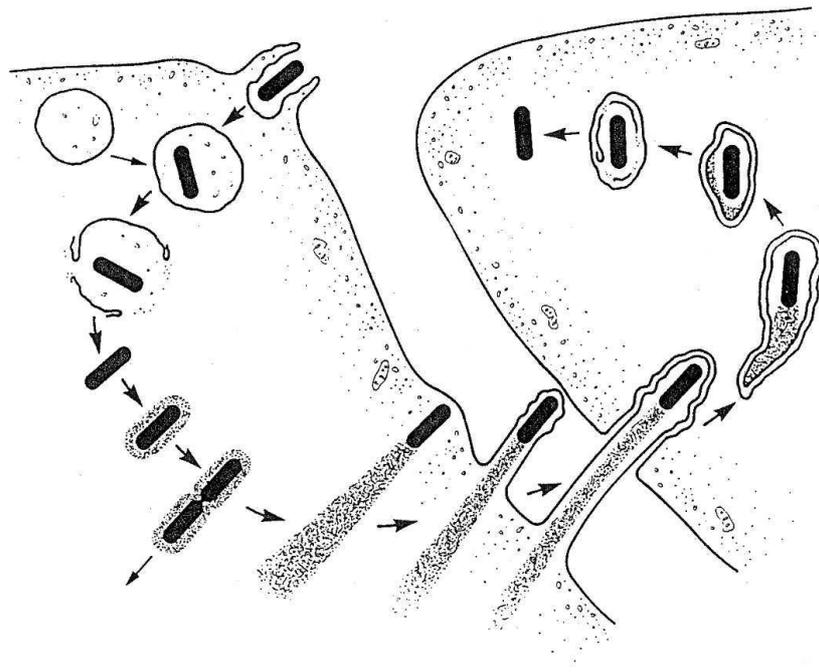


FIG. I.16: Cycle infectieux de la bactérie *Listeria monocytogenes* [Tilney, 1989]

etc... sont « fournis » par la cellule infectée.

I.3.2 *Listeria* comme modèle d'étude

L'intérêt suscité par la bactérie *Listeria* tient au fait qu'elle permet une meilleure compréhension détaillée des phénomènes liés à l'actine lors de la motilité cellulaire. En effet, la capacité des cellules à ce mouvoir est un phénomène important qui entre en jeu dans des processus fondamentaux aussi divers que la morphogenèse et la prolifération de métastases [Bray, 2001 ; Mitchison, 1996]. Cette locomotion est directionnelle, consomme de l'ATP et est associée à la polymérisation de l'actine. C'est un processus complexe où doivent s'orchestrer plusieurs événements tels que la formation de protrusions au front de migration de la cellule, la contraction du cytosquelette ainsi que l'adhésion contrôlée (dans l'espace et dans le temps) de la cellule au substrat [Bray, 2001]. L'implication de la machinerie de l'actine dans bon nombre d'aspects des activités de la cellule, la multiplicité des fonctions et la redondance des protéines interagissant avec l'actine ont rendu difficile l'interprétation des expériences qui ont été menées jusqu'à présent sur les cellules. La motilité de la bactérie et de la cellule présentent de nombreuses similitudes dans les mécanismes (figure I.17). Il a par ailleurs été

confirmé que la structure dendritique formée au bord du lamellipode se retrouve également près de la surface de *Listeria*.

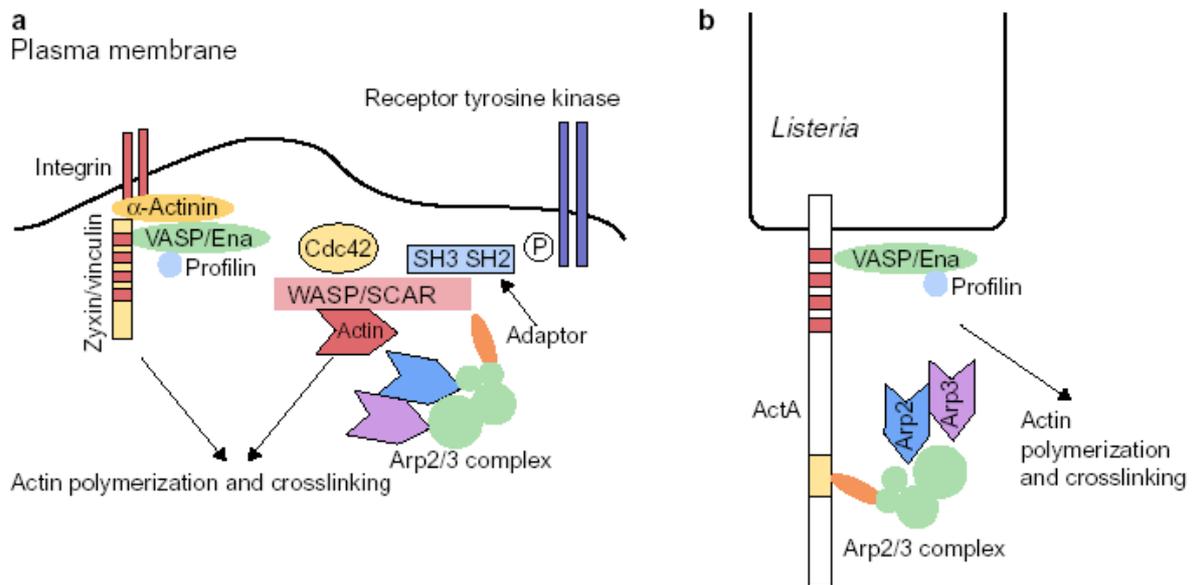


FIG. I.17: Similitude des mécanismes de polymérisation de l'actine près de la membrane plasmique et chez la *Listeria monocytogenes* [Machesky, 1999]

Contrairement au cas de la cellule, chez le pathogène, la polymérisation de l'actine s'effectue à l'extérieur, ce qui facilite grandement l'expérimentation ainsi que l'addition de drogues agissant sur la polymérisation de l'actine directement dans le milieu. De fait, *Listeria* est apparue comme un système simplifié pour l'étude de la motilité cellulaire [Tilney, 1989]. Le pathogène a ainsi contribué de manière significative à la détermination des facteurs essentiels au mouvement [Loisel, 1999] et a permis une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu, tant en biochimie qu'en biophysique.

D'un point de vue physique, l'intérêt se porte sur l'origine et les mécanismes de génération de force induits par la polymérisation orientée de l'actine. Dans ce qui suit, on va s'intéresser aux modèles physiques qui ont été élaborés pour expliquer la propulsion de *Listeria*, modèles qui pourraient être ensuite transposés au mouvement du lamellipode.

I.3.3 Systèmes biomimétiques

I.3.3.1 Billes de latex

Des systèmes modèles encore plus épurés que la *Listeria* ont été mis au point pour avancer dans la compréhension des mécanismes de motilité par l'actine. Cela a été possible dès lors qu'il avait été montré que la seule présence de la protéine ActA à la surface de *Listeria* suffisait pour engendrer son mouvement [Kocks, 1995]. Le greffage de protéines du type ActA à la surface de microbilles de latex a permis de reconstituer le mouvement par polymérisation d'actine comme dans le cas de la bactérie [Cameron, 1999 ; Noireaux, 2000 ; Bernheim, 2002]. En comparaison avec *Listeria*, les avantages d'un tel système résident essentiellement dans le fait de pouvoir faire varier les deux gammes de paramètres que sont :

- Les paramètres physiques tels que la rayon des billes utilisées, la densité de greffage des protéines sur les billes, la rigidité du support utilisé, etc...
- Les paramètres biochimiques comme la nature de la protéine que l'on greffe (ActA, VCA, WA, etc...)

Cela augmente considérablement le spectre des études que l'on peut mener.

I.3.3.2 Milieu reconstitué

Le « cocktail » minimal des protéines nécessaires au mouvement de *Listeria* a été déterminé [Loisel, 1999]. Outre l'actine, Arp2/3 et son activateur (ActA chez *Listeria*), ce mélange contient également de la gelsoline (des protéines coiffantes) et de l'ADF/cofiline. Dans ce milieu, la bactérie se déplace à environ $0,5\mu\text{m}/\text{min}$, ce qui est bien inférieur aux vitesses observées *in vivo*. Aussi, l'addition d' α -actinine, de profiline et de VASP (uniquement dans le cas de *Listeria*) augmente sensiblement la vitesse de la bactérie atteignant des valeurs plus proches de celles observées dans des extraits cellulaires ($\approx 3\mu\text{m}/\text{min}$). Les actions de ces diverses protéines ont été décrites au paragraphe traitant de la régulation de la polymérisation de l'actine *in vivo*.

La reconstitution de ce milieu artificiel représente une avancée majeure dans la compréhension de la biochimie du mouvement. Il constitue également un outil puissant pour les études sur le(s) rôle(s) de protéines impliquées dans la motilité. Ce milieu étant artificiel, il est plus reproductible et homogène que les extraits cellulaires pour lesquels notamment la dilution n'est jamais exactement la même, ce qui modifie parfois fortement le résultat des expériences [Cameron, 2004]. Le milieu reconstitué minimise donc les sources d'artefact possible. On notera cependant que, même si cela n'atteint pas les proportions constatées lorsqu'on travaille avec des extraits cellulaires, on observe des différences notables de comportement de ces ex-

traits reconstitués lorsque ceux-ci sont préparés à partir des protéines issues de purifications faites à différentes dates.

I.3.4 Etudes physiques

D'un point de vue purement théorique, deux approches ont été adoptées par les physiciens pour expliquer les observations expérimentales des mouvements engendrés par polymérisation de l'actine. La première description est « microscopique » ; pour expliquer l'origine des forces qui propulse la bactérie (ou les billes de latex), elle décrit la polymérisation d'un filament d'actine lorsqu'il croît contre une paroi, puis elle extrapole à un nombre n de filaments pour expliquer la locomotion. La seconde approche est celle qui a été développée au sein du laboratoire ; le réseau d'actine est maintenant considéré dans sa globalité comme un milieu continu élastique. Dans cette description « mésoscopique », ce sont les propriétés mécaniques (élastiques) du gel d'actine qui sont à l'origine des forces de propulsion. Les deux interprétations sont successivement présentées ici.

I.3.4.1 Cliquet thermique élastique et filaments attachés : Approche théorique [Mogilner, 2003]

Le modèle du cliquet thermique fut le premier modèle proposé pour tenter d'expliquer les mécanismes de propulsion par polymérisation d'actine tel que *Listeria* et le lamellipode [Peskin, 1993]. Ce modèle se base sur le comportement de filament unique et s'inspire des travaux de Hill sur la cinétique de polymérisation de l'actine [Hill, 1982]. Le scénario du cliquet thermique est fondé sur l'idée que les monomères d'actine s'ajoutent entre la comète et la bactérie à la faveur d'un espacement survenant lors du mouvement brownien de *Listeria*. Les filaments étant considérés comme des bâtonnets rigides, une fois les nouveaux monomères en place, la bactérie ne peut plus revenir à sa position initiale. Ce modèle a ensuite été révisé par Mogilner et Oster afin de prendre en compte les fluctuations élastiques du filament en l'assimilant à un ressort [Mogilner, 1996]. Ces deux versions supposent qu'il n'existe pas de lien entre le pathogène et sa comète. Or des expériences menées par deux équipes différentes ont montré que ce n'était pas le cas : F. Gerbal a tiré sur *Listeria* à l'aide de pinces optiques sans réussir à la dissocier de sa comète [Gerbal, 2000]. D'autre part, S.C. Kuo a observé le mouvement de *Listeria* à l'aide d'un tracking laser et s'est rendu compte que les fluctuations du pathogène (dues à l'agitation thermique) sont environ 20 fois moins importantes que dans la situation où la bactérie n'est pas solidaire de sa comète [Kuo, 2000]. Cela exclut l'hypothèse selon laquelle la bactérie et la comète sont séparées. Devant ces données expérimentales,

Mogilner et Oster ont apporté des modifications à leur modèle de façon à tenir compte de cet aspect.

Cette dernière approche consiste à considérer que les filaments sont attachés de manière transitoire à la surface de la bactérie. Ainsi, le filament naissant serait connecté à la surface par l'intermédiaire des protéines qui activent la polymérisation de l'actine, mais ensuite il se détache et s'allonge librement jusqu'au moment où il est bloqué par des protéines coiffantes. Les filaments attachés à la surface sont sous tension et s'opposent au mouvement de la bactérie alors que ceux qui croissent sont compressés et génèrent la force de propulsion en transmettant leur énergie élastique à la bactérie (figure I.18). Partant de ce scénario, la théorie considère deux populations de filaments :

- les filaments accrochés à la surface par le complexe protéique ActA, VASP/Arp2/3 qui sont au nombre de a
- les filaments détachés et non coiffés au nombre de w dits « working filaments » qui sont à l'origine de la force de propulsion.

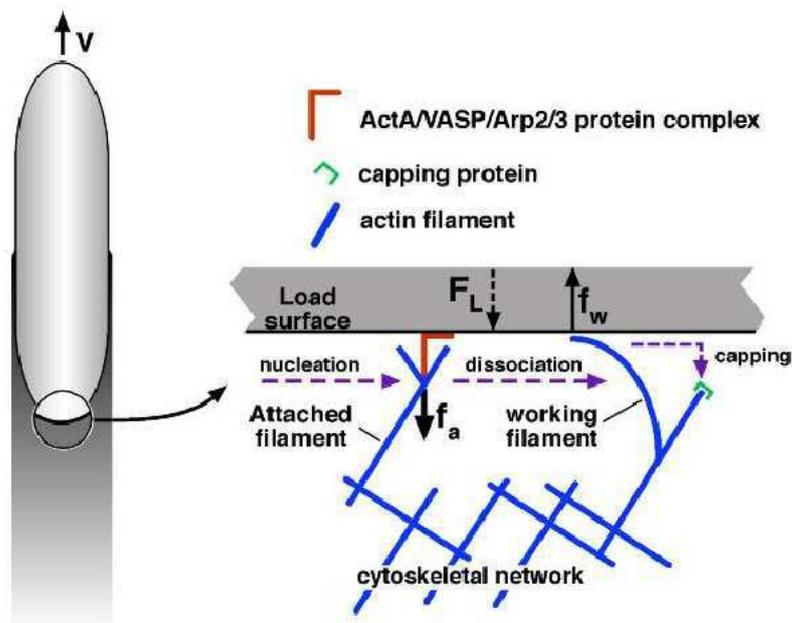


FIG. I.18: Scénario du modèle : Les filaments nucléent à une vitesse n , ils se désolidarisent de la surface pour devenir des « working filaments » à une vitesse δ . Ils sont ensuite eux même cappés à une vitesse κ . La force f_w exercée par les filaments attachés est balancée par le force de retient f_a des filaments attachés. Et la force appliquée sur la bactérie est $F_L = F_{ext} + \zeta V$. [Mogilner, 2003]

Ces deux populations de filaments suivent la cinétique suivante :

- Filaments attachés : $\frac{da}{dt} = n - \delta a$ où n et δ sont respectivement les taux de nucléation et de détachement de filaments.

- Filaments travaillant : $\frac{dw}{dt} = \delta a - \kappa w$

où κ est le taux de coiffage des filaments détachés.

Ces équations deviennent à l'état stationnaire $a=n/\delta$ et $w=n/\kappa$. Chaque filament travaillant exerce une force f_w qui propulse la bactérie, au contraire un filament attaché exerce une force f_a qui la retient. Si F_L est la force extérieure appliquée ($F_L = \zeta V + F_{ext}$), l'équilibre des forces s'écrit :

$$F_L + f_a a = f_w w$$

Les forces f_a , f_w ainsi que le taux de dissociation dépendent de la vitesse V du pathogène. Les auteurs assimilent la vitesse de la bactérie à celle de la croissance d'un filament. Si le filament n'était pas sous contrainte, il aurait une vitesse d'élongation $V=V_{max}-V_{dep}$ où V_{max} et V_{dep} sont les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation d'un filament libre (à son bout barbé). Lorsqu'il est soumis à une force f_w , seule la vitesse de polymérisation est affectée [Mogilner,1996] :

$$V = V_{max} \exp\left(\frac{-f_w l}{k_B T}\right) - V_{dep}$$

Où l est le pas moyen qu'un filament d'actine effectue lors de l'ajout d'un monomère.

De la même manière, le taux de décrochage δ dépend de la force f appliquée sur la liaison moléculaire qui lie le filament à la surface et peut s'écrire [Evans, 2001 ; Evans et Ritchie, 1999] :

$$\delta \approx \delta_0 \exp(f/f_b)$$

Où δ_0 est le taux de décrochage en l'absence de force appliquée, et f_b représente la force de la liaison entre le filament et la protéine qui le lie à la surface de la bactérie (≈ 10 pN).

La force exercée sur la liaison n'est pas constante. En effet, au moment où la liaison se crée, aucune contrainte n'est appliquée. Puis au fur et à mesure de l'avancement de la bactérie par rapport au gel, une tension apparaît au niveau du lien qui augmente avec le temps (car la bactérie qui s'éloigne tire sur le lien). Ainsi, d'un point de vue mécanique, le filament et la protéine qui le lie à la surface sont équivalents à un ressort de raideur k . Dans le cas d'un mouvement uniforme de vitesse V , on peut écrire $f=k \cdot V \cdot t$ et δ s'écrit :

$$\delta(V, t) \approx \delta_0 \exp(kVt/f_b)$$

Cette équation illustre bien la dépendance en vitesse et en temps du processus.

Le principal reproche que l'on peut faire à ce modèle est qu'il possède un grand nombre de paramètres ajustables, ce qui le rend difficile à tester expérimentalement.

I.3.4.2 Croissance d'un gel d'actine en symétrie sphérique : approche théorique et expérimentale

En utilisant des billes de latex fonctionnalisées avec la protéine ActA à leur surface et en mettant ces billes dans des extraits cellulaires Hela, l'équipe de C. Sykes a étudié l'influence de la taille des billes utilisées sur le gel d'actine formé. Ils ont pu observer deux comportements (figure I.19) :

- les billes ayant un rayon de l'ordre du micron ou inférieur (figure I.19a) forment parfois des comètes et se déplacent comme la *Listeria*
- pour les billes de rayon supérieur au micron, le gel d'actine croît de façon isotrope autour de la bille jusqu'à atteindre une épaisseur stationnaire. L'expérience a montré que cette épaisseur dépend du rayon de la bille utilisée : plus le rayon est petit, plus le gel a une faible épaisseur (figure I.19b).

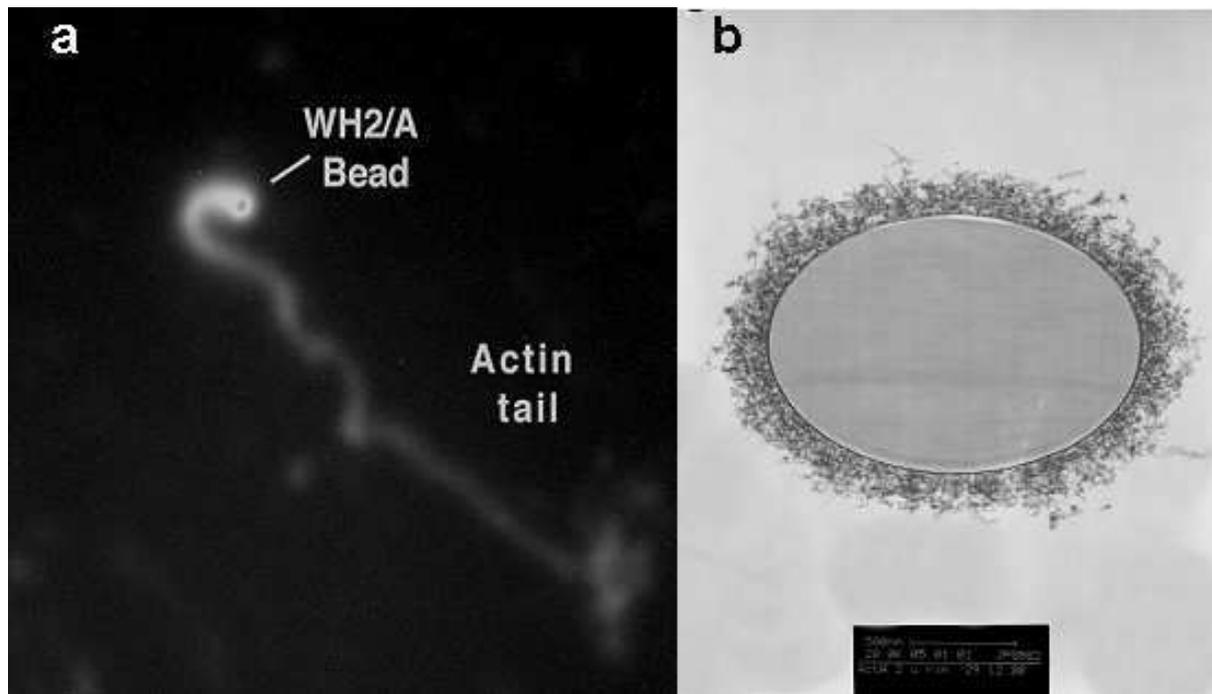


FIG. I.19: (a) Bille se propulsant par polymérisation d'actine vue par microscopie de fluorescence, l'actine est ici marquée avec un fluorophore, (b) une bille de $2\mu\text{m}$ de diamètre recouverte d'ActA vue par microscopie électronique : elle s'entoure d'un gel d'actine isotrope sans former de comète [Plastino, non publié].

Croissance limitée par la contrainte

L'interprétation de ces résultats a été faite en utilisant une analyse mésoscopique du problème proche de celle exposé dans le modèle élastique de propulsion de *Listeria* (cf. paragraphe I.3.4.3). Cela met clairement en évidence la contrainte radiale qu'exerce le gel d'actine sur la surface de la bille et qui gêne l'insertion de nouveaux monomères entre le gel et la surface de la bille (figure I.20).

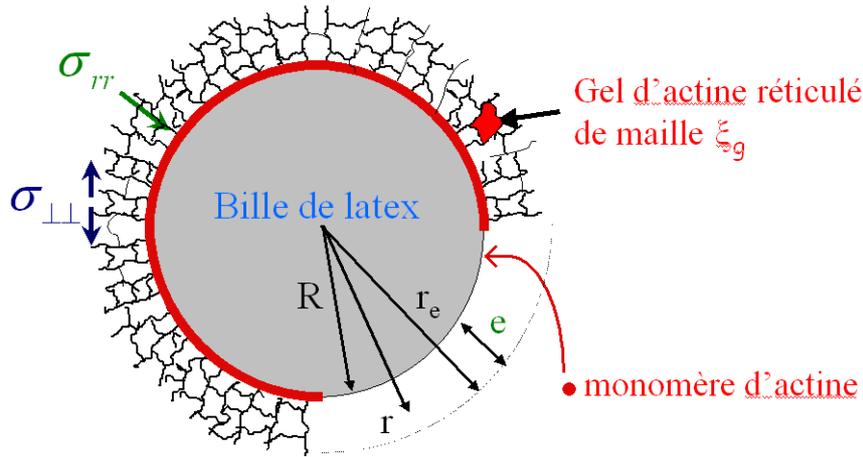


FIG. I.20: Schéma illustrant la croissance d'un gel d'actine autour d'une bille de rayon R en latex qui est recouverte d'ActA. Le gel d'actine croît au tour de la bille, son épaisseur est définie par $e = r_e - R$. Le réseau d'actine de maille ξ_g est sous tension, il en résulte un tenseur de contraintes dont les composantes radiale σ_{rr} et tangentielle $\sigma_{\perp\perp}$ sont représentées. La contrainte normale exerce une pression sur le gel qui gêne l'insertion de nouveaux monomères. Modifié d'après Noireaux et al. 2000

Plus la bille est petite, plus le rayon de courbure est important, de sorte que, pour une même épaisseur de gel e , la contrainte ressentie à la surface de la bille sera d'autant plus importante que la bille est petite.

La polymérisation de l'actine se fait à la surface de la bille, dans une première approximation, on peut dire que le gel s'arrête de croître quand le gain d'énergie chimique E_χ dû à l'ajout d'un monomère devient égal à l'énergie élastique E_{el} qu'il est nécessaire de fournir pour déformer le gel avant de pouvoir insérer un nouveau monomère. L'égalisation de l'énergie chimique et de l'énergie élastique donne une valeur de l'épaisseur de gel limite :

$$e_{\text{lim}} = R \sqrt{\frac{\Delta\mu}{Ca\xi^2}}$$

avec :

- R le rayon de la bille
 - C le module élastique du gel d'actine
 - $\Delta\mu$ l'énergie chimique nécessaire à la polymérisation de l'actine
 - ξ la distance entre nucléateurs de polymérisation d'actine
- (la densité de nucléateurs à la surface de la bille est donc égale à $1/\xi^2$).

L'état atteint lorsque $e = e_{lim}$ n'est pas un état d'équilibre mais un état stationnaire. L'épaisseur du gel n'évolue plus, non pas parce qu'il n'y a plus de polymérisation à la surface de la bille, mais parce que la vitesse d'addition des monomères sur la bille est alors égale à la vitesse de dépolymérisation à la surface externe du gel. Ce phénomène est appelé « treadmilling » ou « tapis roulant ». Pour vérifier ce phénomène, V. Noireaux a mis une bille de latex de $10\mu\text{m}$ de diamètre dans des extraits cellulaires contenant de l'actine non fluorescente et a laissée incuber un temps suffisamment important (environ 6 heures) pour être sûr que l'état $e = e_{lim}$ est atteint. Puis il a ajouté de l'actine fluorescente (marquée à la Rhodamine) à la solution. Si l'état atteint est un état d'équilibre et qu'il n'y a plus polymérisation à la surface de la bille, alors on ne devrait pas observer de fluorescence autour de la bille. Or, lorsque l'on suit l'évolution de l'intensité de fluorescence autour de la bille en fonction du temps, on s'aperçoit qu'elle croît jusqu'à atteindre un plateau. Ceci prouve que l'actine continue à polymériser à la surface de la bille après avoir atteint son épaisseur stationnaire. L'intensité de fluorescence augmente jusqu'à atteindre un plateau, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'actine autour de la bille ait été complètement renouvelée. Pour expliquer le treadmilling, on utilise le modèle élastique dont le principe a déjà été exposé précédemment. Nous allons ici détailler les équations de la cinétique de croissance du gel d'actine autour de la bille et nous verrons comment le caractère élastique du gel influence sur la cinétique jusqu'à arriver au treadmilling.

Nous détaillons ici le modèle tenant compte du treadmilling. Il nous sera utile dans la deuxième partie du manuscrit lors de l'étude de la dynamique de croissance du gel. L'idée sur laquelle est fondé ce modèle vient du fait que le gel d'actine qui se forme autour de la bille est un gel réticulé, les filaments d'actine qui se forment au niveau des protéines nucléatrices sur la bille, vont se connecter entre eux.

Les contraintes principalement considérées ici sont la contrainte radiale (normale à la surface) qui appuie sur la bille et la contrainte tangentielle qui exprime la mise sous tension du gel (cf. figure I.20). Ces deux composantes ne sont pas indépendantes, elles sont reliées l'une à l'autre au sein du tenseur des contraintes. Elles dépendent toutes deux du rayon de

la bille et de l'épaisseur du gel. Elles s'écrivent :

- la contrainte tangentielle à la surface du gel $\sigma_{\perp\perp} = C \frac{\epsilon}{R}$
- la contrainte radiale $\sigma_{rr} = C \left(\frac{\epsilon}{R}\right)^2$

La contrainte σ_{rr} appuie sur la bille et gêne la polymérisation des monomères d'actine à la surface de la bille. Cinétiquement, la polymérisation de l'actine va donc dépendre de σ_{rr} . Si on tient compte de la polymérisation et de la dépolymérisation, le taux de croissance à la surface de la bille va s'exprimer comme :

$$U^+ = \frac{dn^+}{dt} = C^+ \omega_p^+ - \omega_d^+$$

et, à la surface du gel

$$U^- = \frac{dn^-}{dt} = C^- \omega_{\bar{p}} - \omega_{\bar{d}}$$

Les indices p et d font référence respectivement à la polymérisation et à la dépolymérisation, $+$ et $-$ faisant référence aux extrémités $(+)$ et $(-)$ des filaments d'actine. On rappelle ici que, comme pour la *Listeria*, la polymérisation à la surface des billes se fait de manière polarisée, les bouts barbés (bout $(+)$) étant dirigés vers la surface de la bille et le bout pointu (bout $(-)$) vers l'extérieur.

Les termes $C^+ \omega_p^+$ et $C^- \omega_{\bar{p}}$ représentent les taux de polymérisation aux bouts $(+)$ et $(-)$. La vitesse de polymérisation à chaque extrémité d'un filament d'actine dépend de la concentration en monomère présente dans le milieu qui les entoure, C^+ et C^- sont les concentrations en monomères d'actine respectivement à la surface de la bille et du gel. On peut noter que si la diffusion des monomères est suffisamment rapide, dans tout le milieu on aura alors $C^+ = C^-$. ω_d^+ et $\omega_{\bar{d}}$ représentent les taux de dépolymérisation aux bouts $(+)$ et $(-)$ et contrairement au cas de la polymérisation ils ne dépendent pas de la concentration en actine du milieu. Au bout $(+)$ la polymérisation est plus rapide qu'au bout $(-)$ (cf. paragraphe 1.2.1.3) et on peut considérer que **la polymérisation se fait essentiellement au bout $(+)$ et la dépolymérisation au bout $(-)$** (on peut négliger la polymérisation au bout $(-)$).

Les termes de vitesse de polymérisation et dépolymérisation ω_d^+ à la surface de la bille dépendent de la contrainte radiale σ_{rr} [Kramers, 1940]. Comme dit précédemment, σ_{rr} est

fonction de l'épaisseur e du gel et du rayon R de la bille. Les taux de polymérisation ω_p^+ et dépolymérisation ω_d^+ au bout "+" s'écrivent alors :

$$C^+ \omega_p^+(\sigma_{rr}) = C^+ \omega_p^+ |_{\sigma_{rr}=0} \exp \left[-\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right]$$

$$\omega_d^+(\sigma_{rr}) = \omega_d^+ |_{\sigma_{rr}=0} \exp \left[+\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right]$$

Où :

- a représente la taille d'un monomère d'actine
- ξ la distance entre deux nucléateurs à la surface de la bille et c'est également ce qui a été pris pour la taille de la maille du gel d'actine.

D'après les équations (1) et (2), la vitesse de polymérisation au bout (+) s'écrit :

$$U^+(t) = C^+ \omega_p^+ |_{\sigma_{rr}=0} \exp \left[-\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right] - \omega_d^+ |_{\sigma_{rr}=0} \exp \left[+\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right]$$

Et la vitesse de polymérisation au bout (-) peut être considérée comme constante

$$U^-(t) = \omega_{\bar{d}}$$

Ce modèle impose une relation entre le rayon de la bille et l'épaisseur de gel stationnaire. Ainsi le rapport e/R est une constante qui dépend des caractéristiques physiques du gel comme le module élastique et la maille du réseau.

Expérimentalement, l'utilisation de billes de tailles différentes a permis d'observer que plus la bille est grosse (plus le rayon de courbure est faible), plus l'épaisseur stationnaire est importante (figure I.21).

En accord avec la théorie, le rapport e/R est quasiment constant et égal à 0,1. Ce résultat n'est valable que dans une certaine gamme de rayon de billes. Comme nous allons le voir maintenant, la diffusion des monomères d'actine influe également sur l'épaisseur stationnaire du gel.

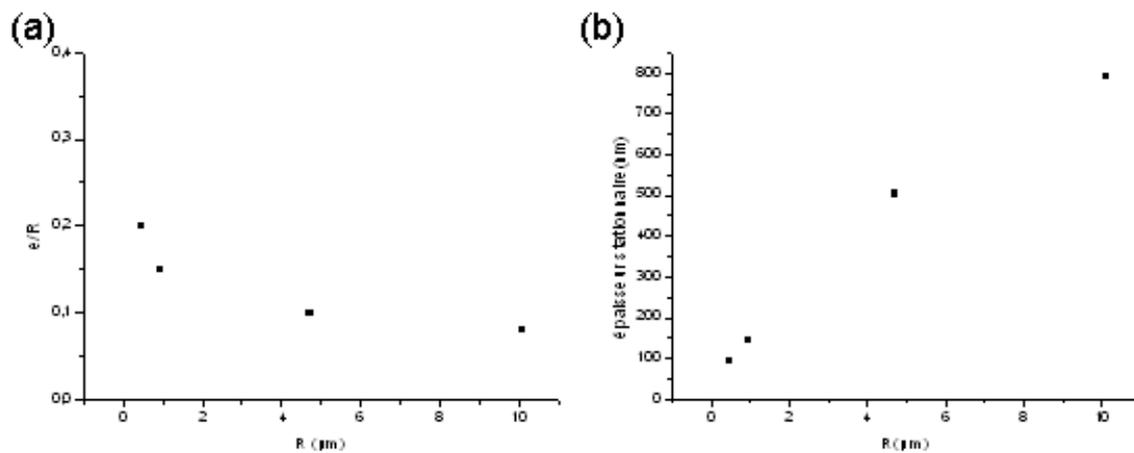


FIG. I.21: Figure 1 (a) variation du rapport e/R en fonction de la taille de la bille, (b) variation de l'épaisseur du gel d'actine à l'état stationnaire suivant le rayon de la bille.

Croissance limitée par la diffusion

En faisant varier la taille des billes utilisées, l'équipe de C. Sykes a constaté qu'à partir d'un certain rayon R de bille, l'épaisseur stationnaire ne dépend plus de R mais elle atteint un plateau (figure I.22).

La diffusion des monomères d'actine à travers le gel est à l'origine de ce phénomène. En effet, si le coefficient de diffusion des monomères à travers le gel est très faible, il arrive un moment où la vitesse de polymérisation de l'actine va être si lente qu'elle compensera juste la dépolymérisation qui a lieu à la surface externe du gel d'actine. Il faut en effet se rappeler que la vitesse de polymérisation dépend de la concentration en monomères dans le milieu environnant, donc si au début de l'expérience la croissance du gel est rapide et qu'elle consomme les monomères d'actine plus rapidement que l'apport de nouveaux monomères par diffusion, alors la croissance sera limitée par ce phénomène. On peut voir sur la figure ref ci-dessus que le rayon de bille à partir duquel on a toujours la même épaisseur stationnaire de gel dépend de la nature de la protéine greffée à la surface des billes (ActA, PRO, NT). Ces différentes protéines interagissent avec l'actine par des voies différentes, les gels qu'elles engendrent sont donc de natures différentes et les coefficients de diffusions de l'actine dans chacune de ces structures seront aussi différents.

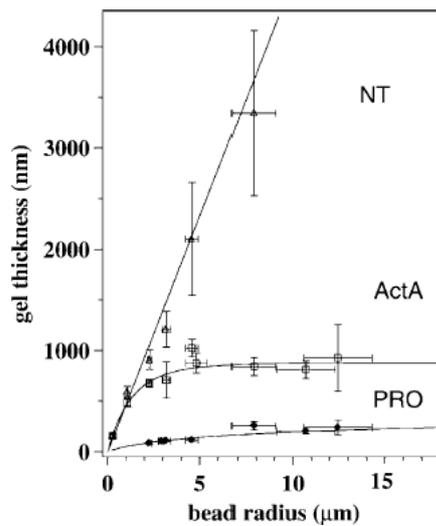


FIG. I.22: Limite par la diffusion : Epaisseur du gel d'actine à l'état stationnaire en fonction du rayon de la bille. Différents nucléateurs de la polymérisation de l'actine ont été testé [Plastino, 2003].

I.3.4.3 Modèle élastique pour le mouvement : Approche théorique [Gerbal, 2000]

Position du problème

Alors que les précédents modèles se basaient sur les caractéristiques microscopiques de filaments uniques pour expliquer le comportement de *Listeria*, ce modèle présente lui, une vision mésoscopique du système et propose une analyse élastique pour expliquer comment de l'ajout d'un monomère d'actine à la surface de la bactérie résulte la force de propulsion. Le mouvement est ici la conséquence d'une action coopérative des filaments. Ce point de vue se justifie par des expériences utilisant des pinces optiques pour exercer des tensions sur la comète. La comète présente une réponse élastique à la déformation [Gerbal, 2000]. Le module d'Young Y du gel d'actine a été mesuré par ces expériences, celles-ci montrent qu'il est compris entre 10^3 et 10^4 Pa. Ces valeurs ont été récemment confirmées par des expériences observant la croissance des comètes d'actine sur une bille de latex accrochée à une microfibre de verre dont la rigidité est connue [Marcy, 2004].

Entendu que la comète se comporte comme un véritable gel, il est par conséquent possible de se ramener à une description mésoscopique du mouvement de *Listeria* à une échelle plus grande que celle des protéines individuelles. L'idée proposée ici est de dire que l'addition de nouveaux filaments d'actine induit une déformation élastique du gel : la construction d'une couche d'actine nouvellement polymérisée à la surface de la bactérie va compresser le

gel précédemment formé. Ainsi, le gain d'énergie libre produit lors de la polymérisation de l'actine n'est pas directement utilisé pour la propulsion mais est d'abord stocké sous forme d'énergie élastique. Dans cette description, le gel est considéré comme un milieu continu qui peut être traité dans le cadre de la théorie d'élasticité linéaire.

Le modèle

La géométrie de *Listeria* complique l'analyse car suivant l'endroit où a lieu la polymérisation, la contribution à la force de propulsion est différente.

Par exemple, si on considère uniquement la partie cylindrique de la bactérie, si les filaments n'étaient pas connectés les uns aux autres, leur croissance se ferait perpendiculairement à la surface de *Listeria*. Comme les filaments sont connectés entre eux, ils sont courbés, ce qui coûte beaucoup d'énergie élastique (proportionnelle à R^3 où R est le rayon de courbure du gel), ce qui va produire une contrainte importante à la surface du pathogène. Cette contrainte va gêner l'insertion de nouveaux monomères, comme cela a été montré expérimentalement sur des billes [Noireaux, 2000]. Cette partie du gel aura donc tendance à gêner la propulsion.

Le modèle se base donc sur une compétition naturelle entre la croissance du gel qui provient des cotés de *Listeria* et de celui issu de l'arrière, ayant chacun des vitesses et des forces différentes. Par souci de simplification, le problème est séparé en deux parties (figure I.23) :

- le gel interne produit par l'arrière de la bactérie
- le gel externe produit par la partie cylindrique

Les descriptions qui suivent sont faites dans le cadre d'un état stationnaire. Dans la nomenclature, l'indice 1 fera référence au gel interne et l'indice 2 au gel externe.

Contribution du gel interne

On se ramène pour cette partie à un modèle à une dimension. On va considérer dans un premier temps que l'actine polymérise à une vitesse V_{p1} constante depuis l'arrière de la bactérie que l'on assimile à une région plate. On décrit *Listeria* comme un cylindre de section $S_b = \pi r_b^2$ et on fait l'hypothèse ici que le gel n'est produit qu'à l'arrière de la bactérie. La comète est modélisée comme un tube infini homogène et élastique de section S_{t1} (figure I.24). Elle est caractérisée par un module d'Young Y et une contrainte axiale σ_{zz} . Dans le référentiel de la bactérie, la comète se déplace à une vitesse V .

Les forces élastiques de ce modèle sont supérieures de plusieurs ordres de grandeurs aux forces typiques rencontrées par la bactérie lorsqu'elle se déplace. On néglige donc les forces visqueuses résultant de la friction avec le milieu extérieur : la viscosité du cytoplasme est de

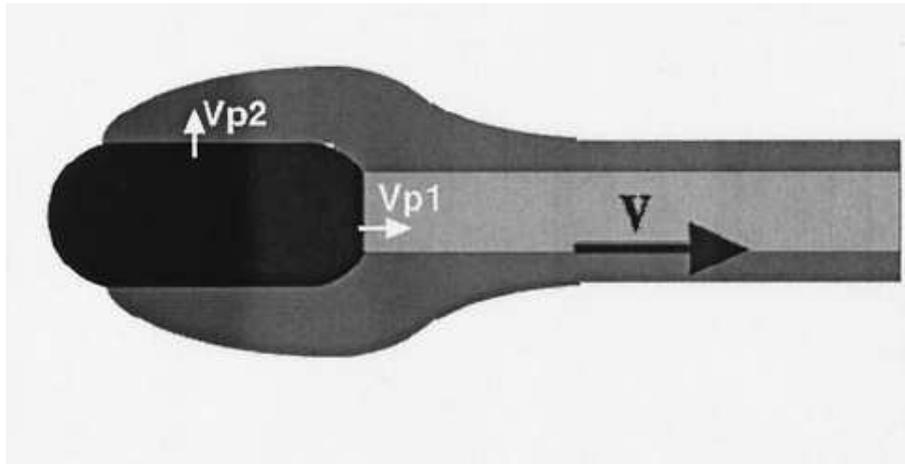


FIG. I.23: Modèle élastique : le système est simplifié en un modèle à deux gels, le gel interne est produit par la partie hémisphérique arrière à une vitesse de polymérisation V_{p1} , et le gel externe est produit par la partie cylindrique à une V_{p2} . Le gel forme une entité unique qui se déplace à une vitesse V dans le référentiel de la bactérie [Gerbal, 2000]

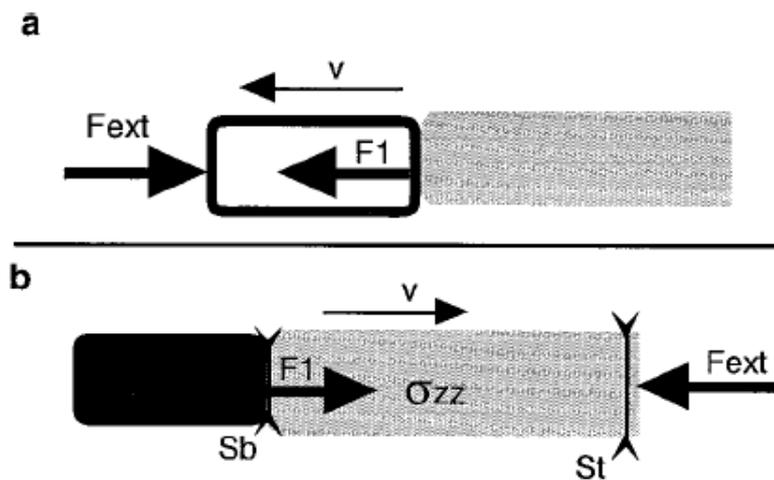


FIG. I.24: Représentation schématique des forces appliquées dans ce modèle à 1 Dimension. (a) dans le référentiel de la comète, la comète exerce une force $F_1 = F_{mot1}$ sur la bactérie qui avance à une vitesse V contre une force F_{ext} . (b) Dans le référentiel de la bactérie qui est celui choisi ici, la comète bouge à une vitesse V . F_{ext} est exercé en toute section de surface S_{t1} de la comète, induisant ainsi un stress axial σ_{zz} . [Gerbal, 2000]

l'ordre de 10^{-2} Pa.s, la force de friction serait donc de l'ordre de 10 fN ce qui est négligeable au regard des forces mises en jeu dans la propulsion de *Listeria*. Les forces exercées sur la bactérie doivent se balancer, on a donc $F_{mot1} = -F_{ext}$ où F_{mot1} est la force qu'exerce la comète sur la bactérie F_{ext} s'exerce également sur toute section de surface S_{t1} de la comète et doit être balancée par la contrainte élastique σ_{ij} qui doit satisfaire la condition $\nabla_i \sigma_{ij} = 0$ [Landau, 1967]. Les composantes radiales et de cisaillement s'annulent à la surface cylindrique de la comète, la composante axiale de la contrainte s'écrit alors $\sigma_{zz} = -F_{ext}/S_{t1}$. D'où l'équation :

$$F_{mot1} = \sigma_{zz} S_{t1}$$

La théorie linéaire de l'élasticité permet de relier cette composante de la contrainte à la composante longitudinale. L'écriture de la conservation du volume d'actine produit permet d'avoir une relation reliant la section de la bactérie à celle de la comète. La conservation du flux d'actine polymérisant permet de relier la vitesse de polymérisation V_{p1} à la vitesse V d'avancée de la bactérie : $V_{p1} S_b = V S_{t1}$. On obtient la relation force-vitesse :

$$\frac{V}{V_{p1}} = \frac{1}{1 + F_{ext} (Y S_b)}$$

On voit ici que l'échelle caractéristique des forces élastiques de ce modèle est donnée par $Y S_b = 1 \text{ nN}$. Ce qui justifie l'approximation précédente sur la friction visqueuse. A titre d'exemple, la force requise pour déformer une membrane est de l'ordre de 50 pN [Evans, 1989]. En linéarisant, on obtient une équation plus « parlante » :

$$\frac{V}{V_{p1}} = 1 - \frac{F_{ext}}{(Y S_b)}$$

On introduit maintenant le fait que la vitesse de polymérisation V_{p1} des filaments à la surface de la bactérie est sensible aux pressions qu'exerce le gel sur la surface. F_{ext} induit au niveau moléculaire une force normale f_{ext} sur les filaments en croissance qui se retrouvent coincés entre la bactérie d'une part et le gel d'autre part. Si f_{ext} comprime le filament, il devient nécessaire de déformer le gel avant de pouvoir insérer le nouveau monomère. Le travail ΔW supplémentaire pour l'addition d'un monomère de taille a s'écrit $\Delta W = f_{ext} a$. La dépendance de la vitesse V_{p1} à la force exercée peut s'écrire [Hill, 1987] :

$$V_p(f) = V_+ \exp\left(-x \frac{\Delta W}{k_B T}\right) - V_- \exp\left((1-x) \frac{\Delta W}{k_B T}\right)$$

Où $0 \leq x \leq 1$ est un paramètre ajustable pris ici égal à 1, V_+ et V_- sont les vitesses de polymérisation et dépolymérisation à force nulle. La force d'arrêt f_s correspond à $V_p = 0$ et

elle ne dépend pas de x . $f_s = (k_B T/a) \ln(V_+/V_-) = (k_B T/a) \ln(\Delta G/k_B T)$ où $\Delta G = 14k_B T$ est l'énergie libre de la réaction de polymérisation d'un monomère [Mogilner, 1996]. Ceci nous donne dans le cas présent une force d'arrêt de l'ordre de 1pN par filament, soit environ 1nN pour la *Listeria* entière si on suppose qu'elle a un millier de filaments à sa surface. En tenant compte de la dépendance de la polymérisation à la force appliquée, on obtient la nouvelle relation force-vitesse :

$$\frac{V_p}{V_{p0}} = \frac{1}{1 + F_{ext}/Y S_b} e^{-(F_{ext}/\epsilon_0 Y S_b)} \approx 1 - 2 \frac{F_{ext}}{Y S_b}$$

On peut voir que la pente de la courbe est maintenant quasiment deux fois celle obtenue en considérant la vitesse de polymérisation constante. Ce qui signifie que la variation de la vitesse de polymérisation affecte aussi bien la vitesse de la bactérie que la force déployée par le gel.

Contribution du gel externe

On fait ici l'hypothèse inverse de celle faite au paragraphe précédent, à savoir que l'on considère maintenant que la *Listeria* produit un gel uniquement sur sa partie cylindrique. De plus on considère que l'actine polymérise à une vitesse V_{p2} perpendiculairement à la surface de la bactérie et que les filaments sont immédiatement connectés entre eux et qu'il n'existe pas de contrainte au début (figure I.25).

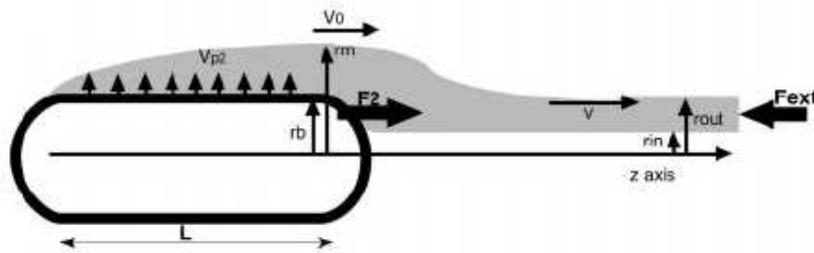


FIG. I.25: Modèle de *Listeria* ne produisant un gel que sur ces parties latérales. Le gel est polymérisé à une vitesse V_{p2} tout autour de sa partie cylindrique (symétrie de révolution). Dans le référentiel de la bactérie, le gel se déplace à une vitesse V_0 et a pour rayon maximum r_m . La comète est creuse et possède un rayon interne r_{in} et externe r_{out} . Elle se déplace à une vitesse V vis à vis de la bactérie. [Gerbal, 2000]

Le cœur de ce modèle réside dans l'idée que de l'actine est constamment ajoutée à la surface de la bactérie et que pour polymériser, il est nécessaire de « soulever » la couche

précédente. On peut voir ce modèle comme un empilement d'élastiques autour d'un cylindre rigide et que les nouveaux élastiques sont rajoutés par dessous au niveau de l'interface cylindre/élastique (figure I.26).



FIG. I.26: Schéma d'une coupe transversale de *Listeria* illustrant la mise sous tension des anciennes couches lors de l'ajout d'un nouvel « élastique » dans le modèle élastique

Dans un mécanisme comme celui-ci, si aucune brisure de symétrie ne survient, la contrainte ressentie à la surface de la bactérie va croître jusqu'à stopper le processus de polymérisation quand on atteint la force d'arrêt des filaments. C'est ce qui est observé lors de la croissance d'un gel d'actine en symétrie sphérique autour d'une bille de latex [Noireaux, 2000] (cf. I.3.4.2) ou chez certains mutants de *Listeria* qui recrutent l'actine mais ne brisent pas la symétrie [Lasa, 1997]. Lorsqu'il y a brisure de symétrie, l'énergie élastique va relaxer ce qui est à l'origine de la formation de la comète et permet le mouvement.

Les calculs ont été ici fait en raisonnant sur la minimisation de l'énergie élastique du gel formé. Les arguments utilisés sont pour beaucoup similaires à ceux pour le gel arrière, comme notamment la conservation du volume du gel et la conservation du flux entre le gel formé sur la bactérie et dans une section de la comète. On obtient par ce biais la relation force-vitesse dans l'hypothèse d'une fine épaisseur de gel autour de la bactérie :

$$\frac{V}{V_0} \approx 1 - \frac{F_{ext}}{2\alpha Y S_b}$$

où $\alpha = (r_m - r_b)/r_b$

On remarque que c'est la même expression que celle trouvée dans le cas du gel interne à ceci près qu'ici le gel est formé à l'arrière de la bactérie sur une surface $2\alpha S_b$ et à une vitesse V_0 (au lieu d'une surface S_b et une vitesse V_{p1} dans le cas précédent).

La force extérieure exercée sur *Listeria* par le gel correspond à l'intégration des contraintes tangentiels et normales sur la surface de la bactérie :

$$F_2 = \int_{\text{Surfacedelabacterie}} (\sigma_{nm} + \sigma_{nt}) ds$$

Cette force peut se décomposer en deux termes ; le premier résultant de l'intégration de la contrainte normale correspond à un terme favorable au mouvement que l'on note F_{mot2} et la second terme qui provient de la contrainte tangentielle va être à l'origine d'une force F_{fric} que l'on peut assimiler à une force de friction entre le gel et la bactérie (figure I.27).

$$F_{mot2} = \int_{\text{Surfacedelabacterie}} \sigma_{nm} ds$$

et

$$F_{fric} = \int_{\text{Surfacedelabacterie}} \sigma_{nt} ds$$

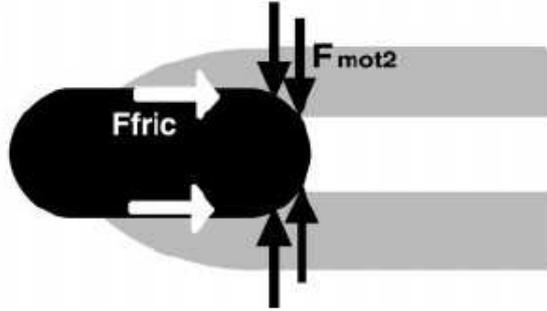


FIG. I.27: représentation des deux composantes de la force F_2 exercée par le gel sur la surface de la bactérie F_{fric} est du à la dynamique de connexion du gel avec la surface et F_{mot2} correspond au stress exercé par le gel sur la partie hémisphérique arrière de *Listeria*. [Gerbal, 2000]

La force de friction a pour origine le lien transitoire qui existe entre le filament et la bactérie lors de la polymérisation. Statistiquement, à chaque instant, il existe un certain nombre de filaments attachés à la surface de la bactérie. De ces liens transitoires résulte la force de friction $F_{fric} = -\gamma * V_0$ où γ est le coefficient de friction et $10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{s} < \gamma < 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{s}$. La limite inférieure de l'encadrement de $\tilde{\alpha}$ est obtenue en disant qu'il est au moins égale à celui que l'on calcule en se basant sur la force maximale que les pinces optiques peuvent appliquer. La valeur supérieure s'obtient en remarquant que le mouvement de la bactérie impose que $F_2 = F_{mot2} + F_{fric} > 0$.

Du fait de la symétrie de révolution qui existe chez *Listeria*, l'intégration de la contrainte normale sur la partie purement cylindrique est nulle. La force motrice ne provient donc que de la partie hémisphérique arrière où le gel est encore en contact avec la bactérie (figure I.27). La force obtenue pour de petites déformations ($V \approx V_0$) et pour une épaisseur de gel assez fine est :

$$\mathbf{F}_{\text{mot2}} \approx \mathbf{Y} \mathbf{S}_b \alpha^3$$

Cette équation implique que la vitesse de la bactérie n'est plus déterminée par la vitesse de polymérisation comme c'était le cas dans le modèle à 1D. Cet effet est surnommé « effet savonnette » car il rappelle le mouvement qui survient lorsque l'on serre une savonnette mouillée entre ces doigts. Ce modèle permet également de décrire le comportement observé chez le mutant ActA_{21-97} de *Listeria* qui se déplace en faisant des bons (figure I.28a) ou le mouvement de bille de latex recouvertes de VCA dans certaines conditions (figure I.28b) [Bernheim, 2002].

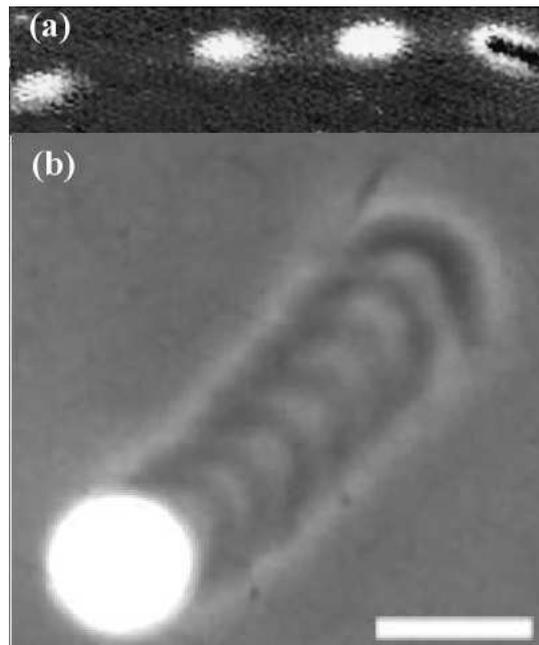


FIG. I.28: (a) Mutant ActA_{21-97} de *Listeria* présentant une locomotion par bons illustrant bien "l'effet savonnette" [Gerbal, 2000], (b) Bille de latex recouverte de VCA qui se déplace par bons dans des extraits de protéines pures [Bernheim, 2002]

Modèle entier

Une vision plus réaliste de *Listeria* nécessite de tenir compte des contributions des gels interne et externe. On a maintenant $F_{ext} = F_1 + F_2 = F_{mot1} + F_{mot2} + F_{fric}$. La présence des deux gels implique la présence de contraintes de cisaillement non nulles, de même il serait nécessaire d'avoir une continuité de la contrainte radiale σ_{rr} à l'interface entre le gel interne et le gel externe. Les auteurs ont choisi de ne pas tenir compte de ces termes argumentant que la complexité ajoutée n'apporterait pas une meilleure compréhension du problème. La seule modification apportée est d'imposer la même vitesse V aux deux gels. Ce changement s'opère naturellement du fait de la dépendance au stress normal de la vitesse de polymérisation de l'actine à la surface de la bactérie. En effet, dans la comète, les deux gels n'en font qu'un et localement la contrainte normale va réguler la vitesse de polymérisation. Il en résulte un comportement très proche de celui où la bactérie ne produit que le gel externe.

Conclusion

Les limites du modèle viennent du fait que toutes les composantes du tenseur de contraintes ne sont pas prises en compte. Les contraintes radiales et tangentielle suffisent à décrire les comportements observés, mais on peut penser notamment que les contraintes de cisaillement peuvent jouer un rôle non négligeable.

Ce modèle a pour intérêt premier de nous offrir une compréhension de la motilité de *Listeria* à une échelle mésoscopique. Il met également en lumière un mécanisme de régulation inédit et qui pourrait bien être générique pour d'autres systèmes biologiques. En effet, le calcul montre qu'augmenter la friction entre le gel et la bactérie ou augmenter la force extérieure qui s'oppose au mouvement a qualitativement le même effet : la bactérie ralentit, le gel a davantage de temps pour croître, ce qui engendre une contrainte plus importante et accroît la force de propulsion. Étant données les forces qu'est capable de générer le gel (de l'ordre du nN), une telle adaptation de la force permet à la bactérie de se déplacer à travers les cellules sans être gênée par les éventuels obstacles qu'elle peut rencontrer. Cela est en accord avec les observations qui montrent que la *Listeria* a une vitesse constante lors de son déplacement même lorsqu'elle rencontre des obstacles. Cela explique également pourquoi des pinces optiques ou l'application d'un champ électrique ne réussissent pas à ralentir le pathogène, car ces techniques engendrent au maximum des forces de 10pN. Le mécanisme exposé dans ce modèle permet également d'expliquer le mouvement par sauts successifs du mutant ActA₂₁₋₉₇ de *Listeria*.

I.3.4.4 Courbure et Brisure de symetrie

Fluctuations thermiques

Van Oudenaarden et collaborateurs ont proposé un modèle théorique pour expliquer la brisure de symétrie d'un gel d'actine autour d'une bille. Il s'inspire du modèle « du cliquet thermique » [Mogilner, 1996] qui relie la croissance d'un filament d'actine à la force que cela peut générer lorsqu'elle se fait contre une paroi (comme c'est le cas pour la *Listeria* ainsi que les autres systèmes utilisant la polymérisation de l'actine pour générer un mouvement). Dans ce modèle, chaque filament est indépendant, la vitesse d'élongation est la même pour tous et ils exercent tous la même force sur le substrat. Van Oudenaarden se base sur ce modèle en y apportant une modification importante : comme les filaments d'actine sont connectés entre eux et forment un réseau dense, la dynamique de chaque filament n'est plus indépendante mais elle est couplée à celle des autres filaments qui constituent le gel. Il développe un modèle stochastique où le gel est décrit comme un système collectif de « cliquets thermiques ». D'un point de vue expérimental ils ont utilisé des billes de polystyrène recouvertes de la protéine *ActA* qu'ils ont ensuite mises dans des extraits cytoplasmiques d'œuf de *Xenopus* supplémentés avec de l'actine fluorescente. Ils ont observé avant que la brisure de symétrie ne se produise, que la bille s'entoure d'un nuage d'actine et que celle-ci se déplace de façon aléatoire dans ce nuage (figure I.29)

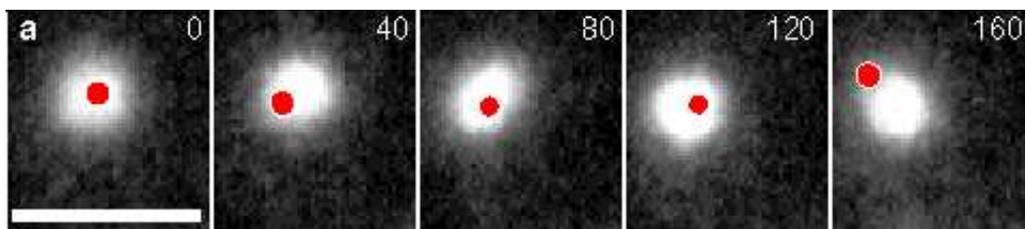


FIG. I.29: Séquence d'images combinant la microscopie de fluorescence et le contraste de phase, montrant une bille ayant une marche aléatoire dans un nuage d'actine avant de spontanément briser la symétrie et se mettre en mouvement. Barre $5\mu\text{m}$ [Van Oudenaarden et Theriot, 1999].

Dans la simulation, le système initial est constitué d'une bille entourée de N filaments d'actine perpendiculaires à la surface et repartis de façon homogène (figure I.30). Chaque filament d'actine est considéré comme une tige élastique de longueur l et le module de courbure B .

La probabilité qu'un monomère d'actine vienne polymériser à la surface de la bille est fonction de la distance du filament par rapport à la bille. Si cette distance est trop courte

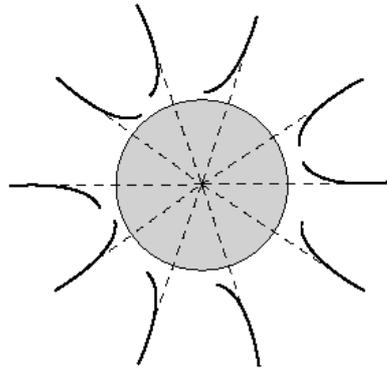


FIG. I.30: Bille entourée de N filaments d'actines perpendiculaires à la surface

(inférieure à la moitié de la taille du monomère), alors le monomère ne pourra pas s'insérer et vice-versa. Le système est soumis à l'agitation thermique, il en résulte au court du temps une variation des distances entre les filaments et la bille ainsi que des probabilités de polymérisation. De la même façon une probabilité de dissociation est arbitrairement fixée constante. Il apparaît une coopération des filaments qui se trouvent du même côté : lorsqu'un monomère vient s'ajouter à la surface de la bille, il va contribuer à maintenir la bille assez loin des filaments qui lui sont proches et favorisant ainsi l'addition de monomère sur ces filaments. C'est ce mécanisme qui mène à la brisure de symétrie et au mouvement directionnel qui s'en suit.

Ce modèle explique la brisure de symétrie de façon simple. Le comportement de la bille est ici particulièrement sensible à la probabilité de dissociation des monomères à la surface de la bille. En effet, suivant la valeur de dissociation utilisée, la bille change drastiquement de comportement, passant d'une bille qui bouge très peu à une bille très mobile. Cependant aucune hypothèse n'est proposée pour expliquer l'origine physique de ces différences. Le modèle présente un certain nombre de défauts, notamment celui de ne pas tenir compte des effets de la géométrie du substrat, ni de sa taille. Or, expérimentalement plusieurs équipes ont remarqué que la brisure de symétrie avait lieu plus souvent sur les billes de faible diamètre. [Cameron, 1999 ; Noireaux, 2000]. Or cette théorie ne tient nullement compte des effets de la géométrie du substrat, ni de sa taille.

Du mouvement continu au mouvement saltatoire [Bernheim,2002]

En utilisant le système biomimétique des billes de latex dans un mélange de protéines purifiées, Bernheim et collaborateurs ont observé, en faisant varier la taille des billes, que

celles-ci brisent la symétrie et se mettent en mouvement pour tous les diamètres de billes qu'ils ont utilisées (1 à 10 μm de diamètre); alors qu'on se souvient que les mêmes billes utilisées dans des extraits cellulaires Hela ne brisent la symétrie que lorsqu'elles ont un rayon inférieur au micron. Les comportements différents des gels formés dans les extraits cellulaires et les extraits reconstitués, nous indiquent que les structures de ces gels doivent être différentes. On peut penser notamment au fait que dans les extraits cellulaires il y a beaucoup plus de protéines capables de réticuler l'actine et ainsi rendre le gel plus rigide et plus difficile à casser. La brisure de symétrie peut être caractérisée par la mesure du temps entre le moment où la bille est mise dans les extraits cellulaires et celui où elle se met en mouvement. Dans le cas présent, cette mesure montre que ce temps de brisure de symétrie varie linéairement avec la taille des billes (figure I.31).

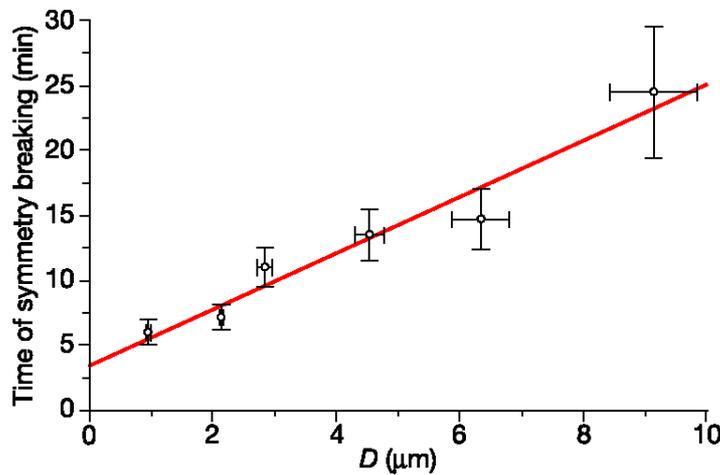


FIG. I.31: Dépendance linéaire du temps que met le gel d'actine à briser sa symétrie en fonction de la taille de la bille autour de laquelle il croît.

Notamment, un des facteurs primordiaux dans le processus qui mène à la brisure de symétrie est, du fait de la géométrie du support, l'accumulation de contraintes élastiques dans le gel lors de sa croissance. La contrainte latérale $\sigma_{\perp\perp}$ dans le gel est proportionnelle au module d'Young C du gel, c'est à dire aux propriétés élastiques du gel, et est inversement proportionnel au rayon R de la bille : $\sigma_{\perp\perp} = C \frac{e}{R}$ où e est l'épaisseur du gel. En faisant l'hypothèse d'être assez loin de l'épaisseur stationnaire du gel pour sa vitesse de croissance soit quasi linéaire, alors le temps de brisure de symétrie obtenu dépend linéairement de la taille de la bille.

Au cours de la même étude, il a également été montré que, changer la densité de nucléateurs

(VCA ici) ou changer la taille des billes, a un impact sur le type de mouvement observé. Ainsi, ils ont pu constater qu'en saturant la surface des billes avec de la VCA, les petites billes de rayon r inférieur à $2\mu\text{m}$ ont un mouvement continu alors que celles dont le rayon est supérieur à $3.5\mu\text{m}$ se déplacent par bonds réguliers et entre ces deux rayons, les billes font des bonds irréguliers (figure I.32).

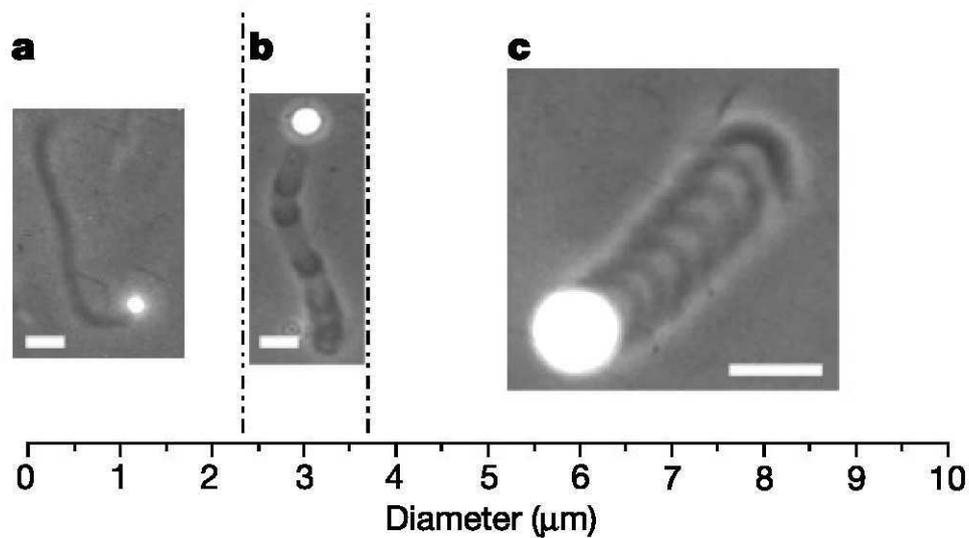


FIG. I.32: Différents régimes de propulsion suivant la taille des billes [Bernheim, 2002]

Ces résultats ont été interprétés dans le cadre du modèle élastique présenté au paragraphe (1.3.4.2). Le comportement observé ici, à savoir la transition entre le régime de déplacement avec un gel continu jusqu'au cas de déplacement par bond périodique, soulèvent la question de savoir si la cellule utilise parfois ce type de mécanisme pour contrôler la nature du gel formé. On peut notamment penser à une stratégie consistant en la maîtrise par la cellule de la densité d'activateurs de la polymérisation d'actine dans certaines régions membranaire pour contrôler la polymérisation de l'actine suivant ces besoins. Mais cette hypothèse reste à démontrer.

I.4 Conclusion

Cette première partie a décrit la complexité des mécanismes biochimiques et biophysiques régissant les comportements d'une cellule. Plus particulièrement, nous avons vu que l'actine, par de nombreuses voies de régulations, contribue à l'architecture et au mouvement de la cellule. Par l'intermédiaire des ABPs (Actin Binding Proteins), la cellule contrôle l'actine à toutes les échelles et de différentes manières. Elle contrôle les cinétiques d'assemblage des monomères d'actine et de dépolymérisation des filaments. Certaines ABPs permettent de modifier la flexibilité des filaments formés. Enfin, des filaments d'actine sont arrangés en réseau tridimensionnel. Toutes ces régulations sont nécessaires pour que l'actine assume, au sein de la cellule, des fonctions très diverses.

L'étude de systèmes biomimétiques utilisant les propriétés de l'actine réduit la complexité de la motilité cellulaire à l'un de ses éléments constitutifs : ces systèmes permettent d'isoler les mécanismes dus exclusivement à l'actine, en particulier sans l'intervention de moteur moléculaire. Les mécanismes de production de force par les réseaux d'actine a été le sujet de mes recherches. Comme cela apparaîtra dans la suite du manuscrit, je me suis appuyé sur la description mésoscopique du gel d'actine que je viens de développer en détail au cours de ce chapitre.

Chapitre II

Croissance d'un gel d'actine et brisure de symétrie

La cellule doit réguler l'actine à la fois dans l'espace et dans le temps. Dans cette deuxième partie nous nous intéresserons plus précisément à l'aspect dynamique de la croissance du réseau d'actine. Nous tenterons notamment de comprendre dans quelle mesure cette dynamique peut participer au mécanisme de déstabilisation de la symétrie du gel, étape nécessaire pour que le système acquière la polarité nécessaire au mouvement. Pour ces études, nous avons utilisé le système biomimétique des billes de latex décrit au chapitre précédent (cf. I.3.3.1). Le marquage fluorescent de l'actine nous a permis de suivre la dynamique d'assemblage de l'actine à la surface de la bille au cours du temps. Cette seconde partie comprend successivement une description des approches théoriques et expérimentales que nous avons entreprises.

Sommaire

II.1	Approche théorique à une dimension	61
II.1.1	Position du problème	61
II.1.2	Modèle des points de réticulation	64
II.1.3	Modèle de diffusion des monomères d'actine	69
II.2	Approche expérimentale	73
II.2.1	Protocole expérimental et observations	73
II.3	Modèle à deux dimensions	77
II.3.1	Présentation du modèle	77
II.3.2	Etudes des modes de Fourier et limitations expérimentales	84
II.3.3	Conclusion	85
II.4	Conclusion	86

II.1 Approche théorique à une dimension

Les deux modèles que l'on va développer ici se basent sur la description élastique du gel d'actine exposée précédemment qui montre que la polymérisation de l'actine à la surface de la bille est perturbée par la présence du gel élastique (cf. I.3.4.2). Dans ce qui va suivre, l'origine de l'état stationnaire reside dans la contrainte radiale qui appuie sur la bille et gêne la polymérisation. L'épaisseur du gel n'évolue plus lorsque la polymérisation à la surface de la bille est strictement compensée par la dépolymérisation qui a lieu à la surface externe du gel.

Jusqu'à présent, les modèles présentés ne s'intéressaient pas à l'aspect dynamique des réseaux d'actine. Pour tenter de comprendre la dynamique de croissance du gel d'actine, entre l'état initial sans gel et l'état stationnaire, deux scénarios vont être testés. Dans le premier modèle, on considère que la vitesse de dépolymérisation à la surface du gel est également affectée par les contraintes élastiques, alors que le second modèle teste l'effet de la déplétion en monomère d'actine à la surface de la bille sur la croissance du gel.

II.1.1 Position du problème

On a vu précédemment dans le modèle élastique, que la pression qu'exerce le gel d'actine sur la surface de la bille limite la croissance de ce gel. En reprenant les équations des vitesses de croissance du gel au bout barbé

$$U^+(t) = A_1 \exp \left[-\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right] - A_2 \exp \left[+\frac{\sigma_{rr} a \xi^2}{2k_B T} \right]$$

et au bout pointu

$$U^-(t) = A_3$$

Où :

A_1 , A_2 et A_3 sont des constantes de vitesse,

σ_{rr} est la contrainte radiale qu'exerce le gel sur la bille

a est la taille d'un monomère d'actine

ξ est la maille du réseau d'actine

L'évolution de l'épaisseur e du gel au court du temps s'écrit simplement

$$\frac{de}{dt} = a [U^+(t) - U^-(t)]$$

La vitesse de polymérisation est ici affectée par la contrainte σ_{rr} . Si on se réfère à l'article de V. Noireaux [Noireaux, 2000] pour les valeurs des différents paramètres physiques tels que le module élastique du gel et la maille du réseau d'actine, et qu'on effectue une simulation numérique de ce modèle, on obtient la courbe :

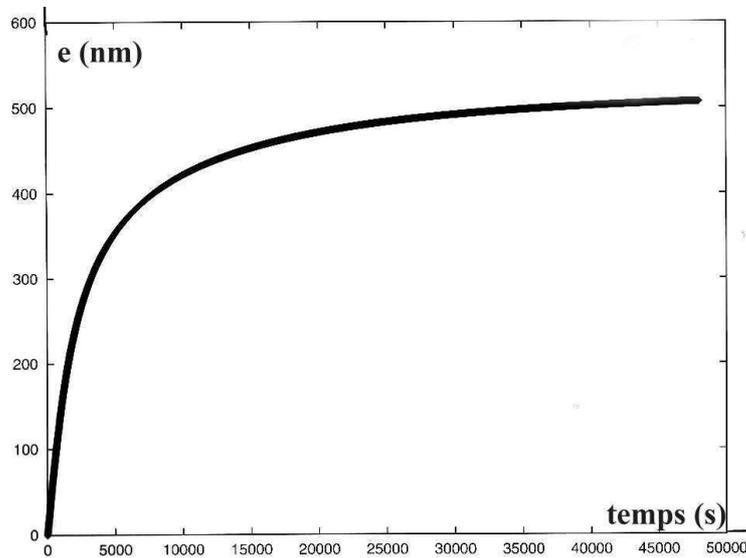
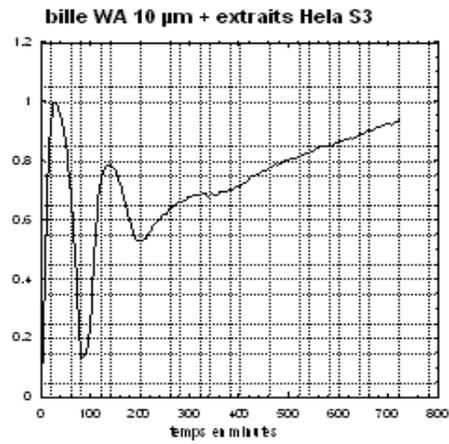


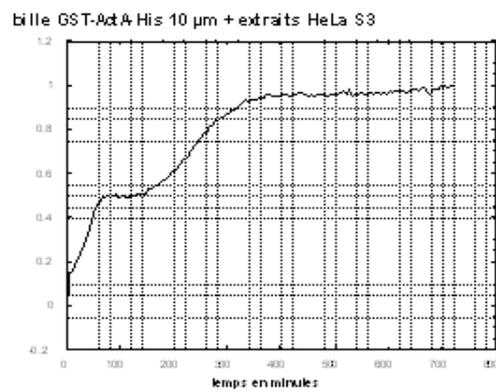
FIG. II.1: Simulation numérique du « modèle de la contrainte ».

En ajoutant des monomères d'actine marqués avec un fluorophore (la rhodamine) dans les extraits cellulaires, V. Noireaux a pu suivre le recrutement de l'actine par la bille au court du temps. L'évolution de l'intensité de fluorescence autour de la bille permet de suivre la dynamique de croissance du gel d'actine. Les observations expérimentales varient suivant la nature et la densité du nucléateur utilisé (ActA, WA, etc...). Dans tous les cas, on n'observe jamais de profil similaire à celui obtenu par la simulation numérique du modèle de la contrainte. Sur la figure II.2, on peut voir deux exemples de profil de croissance qui ont particulièrement retenu notre attention.

On observe dans ces expériences que le gel ne croît pas de façon monotone comme le prédisait le modèle développé dans la première partie (figure II.1). Bien que les profils présentés ci-dessus, et notamment celui où l'on voit des oscillations de l'épaisseur du gel, ne soient pas les plus communément observés, leur caractère particulièrement « turbulent » apparaît comme une piste intéressante pour expliquer les mécanismes susceptibles de conduire à une brisure de symétrie du gel. On se rappelle en effet qu'on observe la formation de comètes uniquement sur des billes de petites tailles (cf. I.3.4.2) alors que dans le cas général la croissance du gel se fait de manière isotrope autour de la bille. La formation d'une comète d'actine



8



8

FIG. II.2: Profil de croissance du gel d'actine au court du temps : (a) billes recouvertes de WA, (b) billes recouverte de GST-ActA-His

requière préalablement qu'il y ait eu brisure de la symétrie sphérique du gel. Or les billes de petites tailles possèdent deux facteurs qui peuvent favoriser la survenu d'un tel événement :

- d'une part leur rayon de courbure est plus important et les contraintes exercées par le gel deviennent importantes plus rapidement que pour une bille de grande taille
- d'autre part la surface de ces billes étant réduite, le nombre de filaments d'actine qui constituent le gel est moins important. On peut donc penser qu'en cas de défaut local sur le gel, cette perturbation prendra plus facilement de l'ampleur car il y a moins de gel pour supporter ce déséquilibre que dans le cas d'une grosse bille.

Nous pensons que la croissance « turbulente » du gel favorise la survenu d'inhomogénéité dans le gel et lorsque cela survient, la contrainte tangentielle à la surface du gel n'est plus compensée, ce qui peut mener à un état instable du système et finalement à une brisure de symétrie.

Le premier modèle, basé sur la contrainte exercée par le gel sur la bille, prévoit bien la taille du gel à l'état stationnaire, mais il ne rend pas compte de la dynamique du gel avant d'atteindre cette épaisseur. Pour tenter de comprendre les mécanismes qui régissent la croissance du gel autour de la bille, nous avons collaboré avec des théoriciens de l'institut Curie (F. Jülicher, J. Prost, K. Sekimoto) pour élaborer des modèles théoriques que l'on a ensuite testés par des simulations numériques.

II.1.2 Modèle des points de réticulation

II.1.2.1 Idées générales du modèle

La nouveauté de ce modèle est de considérer que l'élasticité du gel a une influence non seulement sur la polymérisation et la dépolymérisation à la surface de la bille (comme cela a été le cas jusqu'à présent), mais également sur la dépolymérisation à la surface externe du gel. L'hypothèse nouvelle est ici de dire que les contraintes tangentielles $\sigma_{\perp\perp}$ qui s'exercent sur les points de réticulation font que certains d'entre eux cassent au fur et à mesure de la croissance du gel. On fait l'hypothèse que la vitesse de cassure des points de réticulation à la surface du gel est beaucoup plus lente que la vitesse de dépolymérisation naturelle des filaments d'actine : C'est donc elle qui contrôle la vitesse de dépolymérisation au bout "-". Quand il y a dépolymérisation, on dit qu'elle se fait sur une distance ξ correspondant à la taille d'une "maille" du réseau d'actine, ce qui correspond à la distance entre deux points de réticulation (figure II.3).

Suivant la vitesse à laquelle le gel croît, un nombre plus ou moins important de points de

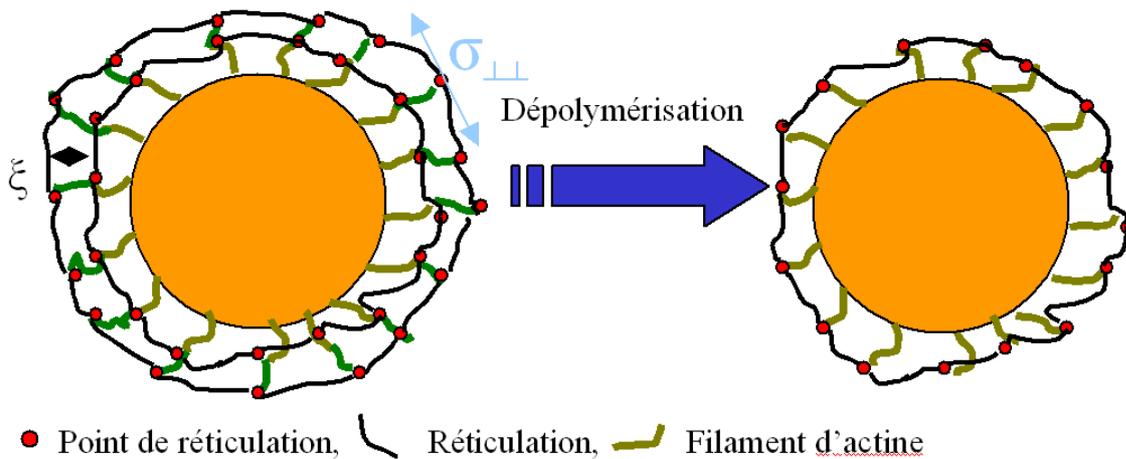


FIG. II.3: Schéma illustrant le mécanisme de dépolymérisation sur la face externe du gel d'actine

réticulation vont atteindre la surface du gel sans avoir cassé auparavant. Pour comprendre l'idée qui se cache derrière cela, il faut suivre la vie d'un point de réticulation entre le moment où il est créé, jusqu'à celui où il casse. Considérons un point de réticulation créé au temps t_0 à la surface du gel en x_0 comme sur le dessin suivant (figure II.4) :

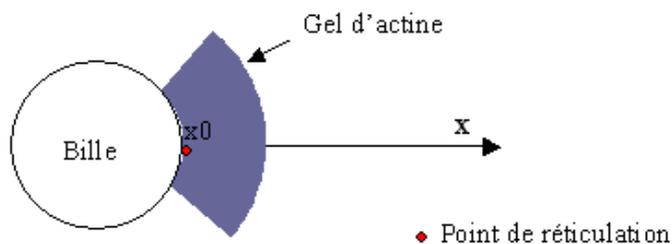


FIG. II.4: Création d'un point de réticulation à la surface de la bille. La probabilité pour que cette réticulation atteigne la surface du gel sans avoir cassé dépend de "l'histoire" du gel.

La probabilité pour que ce point de réticulation ne casse pas avant d'arriver à la surface du gel dépend de la vitesse à laquelle le gel a grandi entre les temps t_0 et t_1 (t_1 sera l'âge de la réticulation quand elle arrivera à la surface du gel si elle ne casse pas avant). Suivant la position x du point de réticulation, celui-ci ne ressent pas la même contrainte. Plus x est grand plus la force qui s'exerce sur le point de réticulation est importante et donc plus sa probabilité de casser augmente. Dès lors on voit que plus le gel croît vite, moins le point de

réticulation passe de temps dans chaque position x du gel, et donc plus la probabilité qu'il casse entre t_0 et t_1 est faible. En effet, la probabilité pour qu'un point casse dépend de la force qui s'exerce sur lui ainsi que du temps pendant lequel cette force lui est appliquée. Le modèle décrit ici est donc un mécanisme basé sur "l'histoire" de la croissance du gel. Les "oscillations" observées expérimentalement seraient, dans ce scénario, le fruit d'un "effet de mémoire" du système : la vitesse de décroissance à la surface du gel au temps t dépend du nombre de points de réticulations présents à cette surface qui dépend lui-même de la façon dont le gel a grandi.

II.1.2.2 Détail des équations

Pour mettre ce modèle en équation, on a utilisé la théorie de Kramers pour les cinétiques des réactions chimiques dans les liquides. Cette théorie a été adaptée par Evan Evans à l'étude de la rupture de liaisons sous l'action d'une force [Evans, 1997]. La taille du gel est ici limitée par la contrainte qu'exerce le gel d'actine sur la bille comme cela a été décrit au paragraphe I.3.4.2 . Les équations, qui décrivent les cinétiques de polymérisation et dépolymérisation à la surface de la bille, restent inchangées par rapport au modèle initial, en revanche, la vitesse de dépolymérisation U^- à la surface du gel est ici affectée par la contrainte tangentielle.

Définitions et notations des termes employés :

Comme précédemment, les indices p et d feront référence respectivement à la polymérisation et à la dépolymérisation, $+$ et $-$ faisant référence aux extrémités (+) et (-) des filaments d'actine.

ω_p et ω_d les taux de polymérisation et de dépolymérisation

U^+ bilan des taux de polymérisation et dépolymérisation au bout "+"

U^- taux de dépolymérisation au bout "-"

e l'épaisseur du gel

de variation de l'épaisseur du gel durant l'incrément de temps dt

C module élastique du gel

a taille des monomères d'actine

ξ taille de la maille du réseau d'actine

t_p âge des points de réticulation à la surface du gel

dt_p variation de l'âge des points de réticulation à la surface du gel durant l'incrément de temps dt

Φ probabilité pour qu'un point de réticulation n'ait pas cassé à t

$\dot{\Phi} = \frac{d\Phi}{dt}$ probabilité pour qu'un point de réticulation casse entre t et $t+dt$

\tilde{e} abscisse du point de réticulation

τ^{-1} la durée de vie moyenne d'un point de réticulation

On définit les constantes α et e^* :

$$\alpha = \frac{Ca\xi^2}{2R^2k_B T} \text{ et } e^* = \frac{2Rk_B T}{Ca\xi^2}$$

On note $A_p = C^+\omega_p^+ |_{\sigma_{rr}=0}$ et $A_d = \omega_d^+ |_{\sigma_{rr}=0}$ les taux de polymérisation et dépolymérisation au bout (+) qui sont ici deux constantes. La variation de l'épaisseur du gel après un temps dt s'exprime simplement comme : $de = a [U^+(t) - U^-(t)] dt$

Pour pouvoir calculer l'épaisseur du gel à chaque incrémentation en temps, il faut connaître $U^+(t)$ et $U^-(t)$ qui sont définis comme suit :

$$U^+(t) = A_p \exp(-\alpha e(t)^2) - A_d \exp(+\alpha e(t)^2)$$

$$U^-(t) = -\xi \dot{\Phi}(t_p(t))$$

$U^+(t)$ est le bilan de la polymérisation et de la dépolymérisation à la surface de la bille, $U^-(t)$ est défini comme étant le taux de cassure que multiplie la longueur ξ d'une maille sur laquelle se fait la dépolymérisation, comme on en a fait l'hypothèse.

Les différentes étapes du modèle qui mènent à la connaissance de $U^+(t)$ et $U^-(t)$ sont :

Conditions initiales : à $t_0 = 0$ on connaît $U^-(t_0)$, $t_p(t_0) = 0$ et $\tilde{e}(t_0) = 0$.

On peut donc calculer la variation de l'épaisseur de du gel durant l'intervalle de temps dt

$$de = a [U^+(t) - U^-(t)] dt$$

$$e(t_0 + dt) = e(t_0) + de$$

On calcule ensuite successivement :

- La variation de l'âge des points de réticulation à la surface du gel durant l'incrément de temps dt (entre t_0 et $t_1 = t_0 + dt$)

$$dt_p = \left[1 - \frac{U^-(t_0)}{U^+(t_0 - t_p(t_0))} \right] dt$$

$$t_p(t_0 + dt) = t_p(t_0) + dt_p$$

- L'abscisse des points de réticulation dans le gel

$$\tilde{e}(\tilde{t}, t_0) = a \int_0^{\tilde{t}} U^+(t_0 - tp(t_0) + t') dt'$$

- La probabilité pour que le point de réticulation n'ait pas cassé à t

$$\Phi(t_p(t_0), t_0) = \exp \left[- \int_0^{t_p(t_0)} \tau^{-1} \exp \left[\frac{e(t')}{e^*} \right] dt' \right]$$

- La probabilité pour qu'un point de réticulation casse entre t_0 et $t_0 + dt$

$$\dot{\Phi}(t_p(t_0), t_0) = \frac{d\Phi}{dt} = \Phi(t_p(t_0), t_0) \left[- \tau^{-1} \exp \left[\frac{\tilde{e}(t_p(t_0))}{e^*} \right] \right]$$

On a maintenant accès à $U^+(t_1)$ et $U^-(t_1)$ où $t_1 = t_0 + dt$:

$$U^+(t_1) = A_p \times \exp(-\alpha \times e(t_1)^2) - A_d \times \exp(+\alpha \times e(t_1)^2)$$

$$U^-(t_1) = -\xi \dot{\Phi}(t_p(t_1))$$

Ce qui donne accès à $e(t_1 + dt) = e(t_1) + de$.

On recommence le même processus à chaque incrémentation en temps dt

Remarque :

L'effet de mémoire de l'histoire du gel qui est le cœur de ce modèle s'exprime dans le terme $U^-(t)$ qui dépend du nombre de points de réticulation présents à la surface du gel. En effet, il est normal que la polymérisation $U^+(t)$ à la surface de la bille ne ressente pas d'influence de l'histoire du gel. En effet, ce qui limite la polymérisation sur la bille, c'est la contrainte radiale qu'exerce le gel, or cette dernière ne dépend que de l'épaisseur du gel.

II.1.2.3 Conclusion du modèle

On a procédé à des simulations numériques de ce modèle. Dans un premier temps, nous avons utilisé pour les différents paramètres les valeurs numériques figurant dans l'article [Noireaux, 2000]. Le résultat obtenu ne montrait pas d'influence notable de la « mémoire de l'histoire du gel » que l'on a introduit dans ce modèle, vis à vis du modèle simple où seul la contrainte exercée par le gel intervient (les courbes obtenues avec le nouveau modèle ressemblent beaucoup à celles obtenues avec le modèle simple). Dans un deuxième temps,

on a fait varier les paramètres du modèle, entre autre ξ représentant la taille de la maille du réseau d'actine et e^* qui fixe l'ordre de grandeur de l'épaisseur du gel à partir de laquelle la contrainte exercée par le gel sur la bille devient importante. Les simulations se sont montrées particulièrement sensibles vis à vis de ces deux paramètres. En poussant de façon excessive les valeurs prises pour les paramètres (entre autre pour ξ), on parvient tout de même à voir un changement de pente lors de la croissance du gel (voir courbe figure II.5).

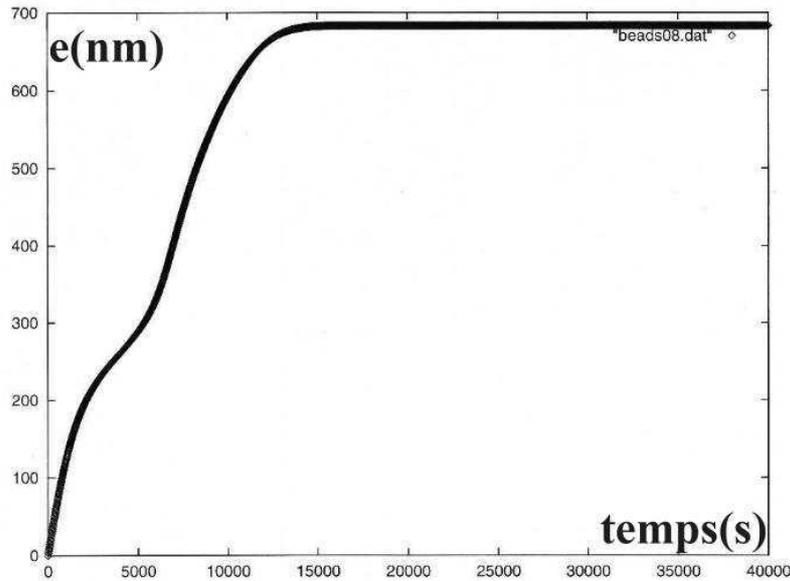


FIG. II.5: Simulation numérique de la croissance du gel d'actine autour d'une bille dans le cadre du modèle de rupture des points de réticulation.

La rupture de pente obtenue dans le cadre de ce modèle ne permet pas de rendre compte des oscillations observées expérimentalement, mais le profil de croissance obtenu est assez semblable au profil expérimental que l'on a précédemment montré sur la figure II.2. Afin de comprendre l'origine des décroissances de l'épaisseur du gel observées expérimentalement, un second modèle a été élaboré, comme nous allons le voir maintenant.

II.1.3 Modèle de diffusion des monomères d'actine

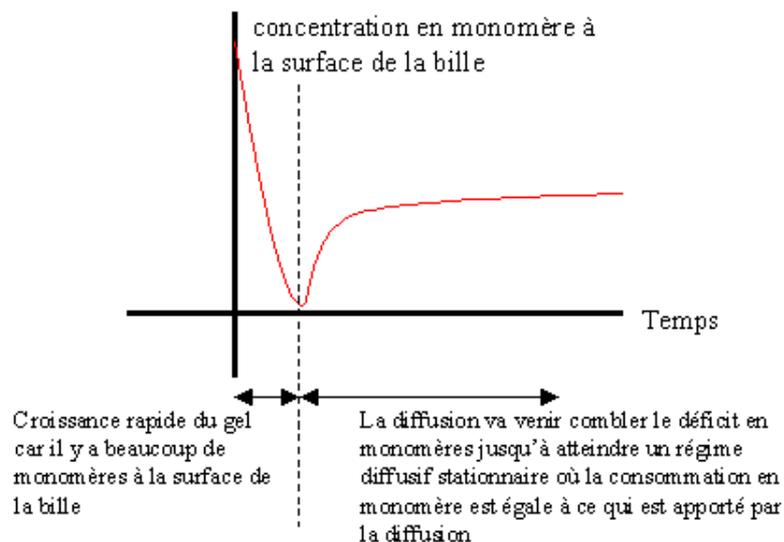
II.1.3.1 Idées générales du modèle

Nous avons vu dans la première partie de la thèse (I.3.4.2) que la croissance du gel d'actine autour de la bille peut être limitée par la diffusion des monomères d'actine à travers le gel. Cette plus lente diffusion des monomères dans le gel pourrait jouer un rôle important

pour expliquer les profils de croissance du gel observés expérimentalement figure II.2 . En effet, si le coefficient de diffusion des monomères d'actine dans le gel est très petit, on peut alors imaginer le scénario suivant :

Dans un premier temps la bille est entourée de monomères d'actine près de sa surface et la contrainte radiale σ_{rr} n'est pas très importante lors des premiers instants. Le gel commence donc par croître rapidement, ce qui a pour conséquence de consommer les monomères qui se trouvent près de la surface de la bille. Si la diffusion n'est pas suffisamment importante pour réalimenter la surface de la bille en monomères, il pourrait alors y avoir un laps de temps durant lequel il y aurait trop peu de monomères à la surface de la bille, ce qui ferait chuter très fortement le taux de polymérisation. Le gel commencerait alors à décroître, car la polymérisation s'arrête faute de monomères aux bouts (+), mais la dépolymérisation aux bouts (-) n'a pas de raison de s'interrompre.

On peut imaginer qu'on aura une évolution de la concentration en monomères à la surface de la bille du type :



II.1.3.2 Détail des équations

Contrairement au modèle précédent, la clef de voûte du mécanisme proposé ici se situe au niveau de la surface de la bille. Il prévoit en effet un déficit en monomères à cet endroit à cause de la diffusion lente des monomères dans le gel. $U^+(t)$ s'écrit de la même manière que pour les modèles précédents :

$$U^+(t) = A_p \exp(-ae(t)^2) - A_d \exp(+ae(t)^2)$$

Mais ici la concentration en monomère au bout (+) n'est plus une constante, elle dépend du temps : $A_p = C^+(t)\omega_p^+ |_{\sigma_{rr}=0}$

C'est à travers cette concentration en actine disponible pour polymériser que s'exprimera l'influence de la diffusion sur la dynamique de croissance du gel. On écrit $U^-(t)$ comme étant une fonction qui croit exponentiellement avec l'épaisseur du gel :

$$U^-(t) = \tau^{-1} \exp\left[-\frac{e}{e^*}\right]$$

Les notations du précédent modèle restent valables ici, viennent s'y ajouter :

J_i flux de diffusion à l'abscisse r_i

D_1 coefficient de diffusion dans le gel

D_2 coefficient de diffusion dans les extraits cellulaires

dC_i variation de la concentration en actine à l'abscisse r_i pendant le temps dt

La variation de concentration se calcule grâce à l'équation :

$$\frac{dC_i}{dt} + \text{div}(J_i) = \theta$$

où θ représente le terme de source.

Pour les besoins de la simulation on linéarise le Laplacien, de même on est amené à discrétiser l'espace en petites parties de taille ε_i , on obtient alors :

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{r_i^2} \frac{[J_{i+1} - J_i]}{\varepsilon_i}$$

avec $J_i = D_i \left[\frac{r_i + r_{i+1}}{\varepsilon_i} \right]^2 \left[\frac{C_i - C_{i-1}}{\varepsilon_{bond}} \right]$ et $\varepsilon_{bond} = \frac{r_{i+1} - r_{i-1}}{2}$

A cela viennent s'ajouter des termes de source pour chacune des deux extrémités :

- à la surface de la bille on a consommation de monomères, d'où la variation :

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{r_i^2} \frac{[J_{i+1} - J_i]}{\varepsilon_i} - \beta^+ U^+(t)$$

avec $\beta^+ = \frac{1}{\varepsilon_i \xi^2}$

- à la surface du gel il y a dépolymérisation :

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{r_i^2} \frac{[J_{i+1} - J_i]}{\varepsilon_i} + \beta^- U^-(t)$$

A chaque incrémentation en temps, on calcule toutes les variations de concentration dans le gel

II.1.3.3 Conclusion du modèle

En faisant varier le coefficient de diffusion de l'actine dans le gel, les simulations montrent que si ce coefficient de diffusion est environ mille fois plus faible que celui de l'actine en solution, alors l'épaisseur stationnaire du gel ne dépend plus du rayon de la bille. Du point de vue de la dynamique de croissance du gel, aspect qui nous intéressait tout particulièrement ici, les simulations n'ont pas montré de comportement oscillant de l'épaisseur du gel. Comme pour le modèle précédent, la diffusion influe essentiellement sur la vitesse de croissance du gel, sans pour autant réussir à induire une décroissance.

II.2 Approche expérimentale

Comme nous l'avions présenté au paragraphe II.1.1, V. Noireaux a observé, dans quelques cas, une décroissance de l'épaisseur du gel d'actine lorsqu'il croît autour de la bille. Il n'a cependant pas déterminé les paramètres responsables d'un tel comportement. Nous avons donc tenté expérimentalement de retrouver les conditions favorables à l'observation d'oscillations de l'épaisseur du gel d'actine lors de sa croissance autour de la bille. Ces fortes fluctuations du gel n'ont été que rarement observées par V. Noireaux sans qu'il ne puisse déterminer les facteurs expérimentaux qui pourraient être à l'origine de ce phénomène. La stratégie adoptée pour tenter de retrouver ces oscillations fut de faire varier la maille ξ du gel d'actine. Ce paramètre est apparu, lors des simulations numériques, comme celui qui influe le plus sur la dynamique de croissance du gel autour de la bille. Pour ce faire, nous avons fait varier la densité de nucléateurs greffés à la surface de la bille.

II.2.1 Protocole expérimental et observations

II.2.1.1 Préparation des échantillons

Le protocole suit deux étapes, la première est celle du greffage sur les billes de latex des protéines qui activent la polymérisation de l'actine (WA ou VCA dans notre cas). La seconde étape est celle du mélange des billes avec les extraits cellulaires Hela et l'observation au microscope de la croissance du gel. Les extraits cellulaires ont été préalablement complétés avec de l'actine fluorescente (actine Rhodamine ou Alexa) pour pouvoir visualiser le recrutement de l'actine par les billes au court du temps. Les billes utilisées ici ont un diamètre de $10\mu\text{m}$. Le greffage de la protéine VCA (ou WA) sur les billes se fait par adsorption physique. On prend $10\mu\text{L}$ de billes (à 2,5% en volume) que l'on lave avec $500\mu\text{L}$ de tampon borate, puis par centrifugation on sépare les billes et le tampon. Les billes sont ensuite mises dans $10\mu\text{L}$ de solution contenant la protéine la VCA pendant 2 heures sous agitation douce. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation et resuspendues dans $20\mu\text{L}$ d'une solution tamponnée de Borate. Dans le but de faire varier la densité de greffage de VCA sur les billes, notre première stratégie fut de faire varier la concentration en VCA de la solution d'incubation ($[\text{VCA}] = 0.01$ à 1mg/ml dans la solution d'incubation). On mélange $0,5\mu\text{L}$ de bille dans $15\mu\text{L}$ d'extraits cellulaires que l'on met entre lame et lamelle pour l'observation au microscope.

II.2.1.2 Observations

Les comportements expérimentaux observés se sont montrés peu sensibles à la variation de la densité de nucléateurs obtenue en faisant varier la concentration en protéines lors de l'étape de greffage des billes. Les courbes de croissance du gel sont les suivantes (figure II.6) :

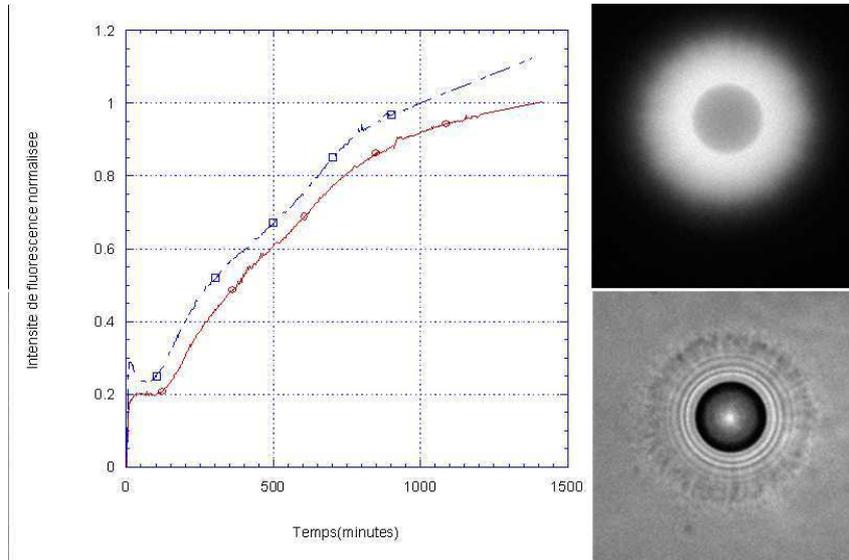


FIG. II.6: Croissance de l'intensité de fluorescence autour d'une bille recouverte de la protéine WA. À gauche on voit l'état final de la goutte, par fluorescence (en haut) et par lumière blanche en dessous. On peut noter que la taille du gel est ici bien plus importante que ce qui est observé habituellement.

Aux cours de la première heure, on observe régulièrement une légère décroissance de l'intensité de fluorescence autour de la bille, mais cela n'est pas comparable aux oscillations montrées précédemment. Il est apparu lors de cette série d'expériences que les extraits cellulaires influent de manière importante sur les comportements observés. En effet, bien qu'ayant également utilisé des extraits Hela lors de ces expériences, V. Noireaux a constaté que le gel d'actine atteint une épaisseur stationnaire e telle que $e/R=0,1$ où R est le rayon de la bille, alors qu'on peut constater sur la figure précédente (II.6) que le rapport e/R est de l'ordre de 1, ce qui signifie que la nature des gels formés lors des expériences effectuées par V. Noireaux et lors de cette série d'expériences sont très différentes. Dans le cas présent, le gel exerce des contraintes plus faibles qui gênent moins la polymérisation de l'actine à la surface de la bille, ce qui influe évidemment sur la dynamique de croissance du gel.

Afin de changer de manière plus marquée la densité de nucléateurs sur les billes, nous avons mis en compétition la VCA avec une autre protéine, la GST (Glutathion-S-Transferase)

qui est inerte vis à vis de l'actine. En changeant les proportions entre GST et VCA lors l'étape de greffage. On a pu vérifier, en mesurant par gel d'acrylamide la quantité de protéines présentes à la surface des billes, que cela fait varier de manière importante la quantité de VCA présente sur les billes, comme on peut le voir sur le la figure II.8.

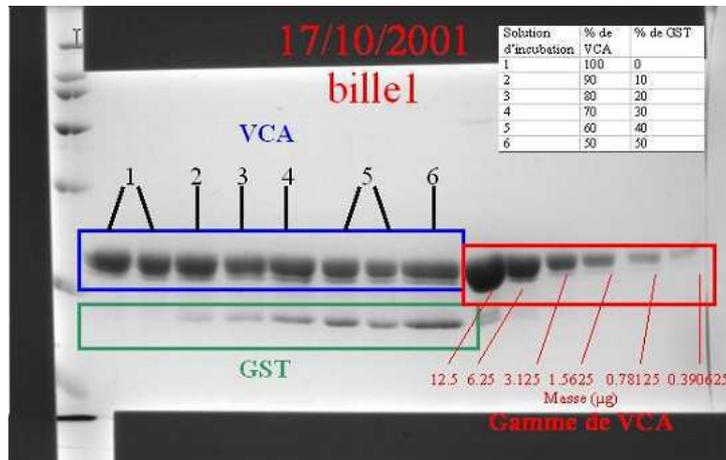


FIG. II.7: Mesure de la quantité de VCA présente à la surface des billes de latex lorsqu'ont met en compétition VCA et GST.

La présence de GST et l'utilisation d'un nouveau lot d'extraits ont donné lieu à l'observation d'une dynamique de croissance du gel qui n'avait pas encore été observée. La polymérisation de l'actine semble mettre environ 1h30 à réellement démarrer, et la croissance est ensuite monotone avant d'atteindre un état stationnaire figure II.8.

On a pu observer qu'en dessous de 40% de VCA (à $28.5\mu\text{M}$) lors de l'incubation des billes, celles-ci ne recrutent quasiment pas d'actine, alors que pour des quantités supérieures en VCA, les courbes de croissances sont sensiblement identiques. Ce qui nous mène à penser que pour des quantités trop faibles de VCA, on atteint une distance entre nucléateurs trop importante pour qu'il y ait réticulation des filaments et formation d'un gel.

Même si on ne peut pas les comparer aux expériences précédentes, du fait de l'utilisation d'une nouvelle préparation d'extraits, ces expériences nous confirment cependant que les dynamiques de croissance de l'actine sont très sensibles aux conditions expérimentales. En effet, ce qui change essentiellement entre deux préparations d'extraits cellulaires, c'est la dilution finale de ces extraits qui n'est pas suffisamment contrôlable à l'heure actuelle compte tenu du mode de préparation. Les concentrations des différentes protéines qui interagissent avec l'actine s'en trouvent changées, ce qui par voie de conséquence influe ensuite non seulement sur la dynamique de polymérisation des filaments d'actine, mais également sur la structuration

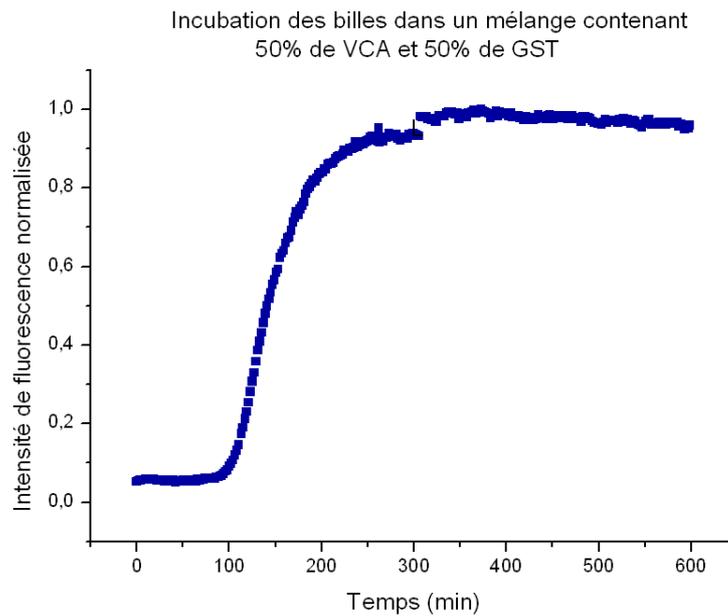


FIG. II.8: Dynamique de croissance de l'actine autour d'une bille ayant incubé dans un mélange contenant 50% de VCA et 50% de GST (à $28.5\mu\text{M}$ chacun).

du gel par les protéines qui réticulent les filaments entre eux.

II.2.1.3 Conclusion

Les oscillations de l'épaisseur du gel ne nous a pas permis de proposer un mécanisme de brisure de symétrie basé sur cet effet. En effet, d'une part les expériences n'ont pas été productibles, d'autre part les simulations numériques des modèles que nous avons élaboré n'ont pas fait apparaître d'oscillations. Nous avons donc abandonné cette voie et avons entrepris l'élaboration d'un modèle bidimensionnel pour étudier la stabilité du gel d'actine lorsqu'il existe un défaut sur le gel. L'approche expérimentale n'a pas permis de déterminer dans quelles conditions il est possible d'observer des décroissances drastiques de l'épaisseur du gel d'actine comme c'est le cas dans les expériences présentés au début de cette partie.

II.3 Modèle à deux dimensions

La brisure de symétrie du gel d'actine apparaît comme un facteur important dans un certain nombre d'événements biologiques. Par exemple, les endosomes qui sont des vésicules lipidiques sphériques se déplacent en formant une comète [Tauton, 2000]. De même, il existe un mutant de *Listeria* qui se déplace en formant un gel d'actine sur son côté latéral en brisant ainsi la symétrie cylindrique du système [Rafelski, 2002]. Le but est ici de comprendre quels sont les principaux éléments qui entrent en jeu dans le processus qui mène à la brisure de symétrie dans le gel.

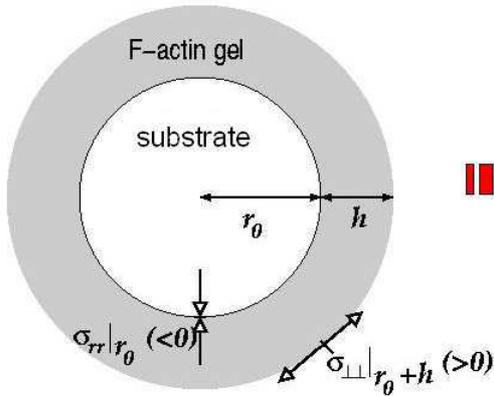
II.3.1 Présentation du modèle

Le modèle présenté ici effectue une analyse élastique à deux dimensions (symétrie cylindrique) d'un gel d'actine en croissance autour d'un substrat cylindrique. Contrairement aux autres modèles présentés jusqu'ici qui se concentraient sur l'influence de la contrainte radiale sur la cinétique de la polymérisation de l'actine, ce modèle tient compte de la distribution globale des contraintes et notamment de la contrainte latérale produite à la surface du gel qui influe sur la dépolymérisation. L'idée est ici de regarder en partant d'un état initial où le gel entour de façon uniforme le substrat, quelle sera la nouvelle distribution des contraintes si on perturbe la symétrie du système en introduisant une épaisseur de gel plus petite à un endroit donné (figure II.9).

La perturbation appliquée ici est périodique, ce qui permet notamment de faciliter les calculs. Cette hypothèse ne constitue pas un point faible du modèle car même si cela ne correspond pas à la réalité des gels d'actine qui présentent des inhomogénéités d'épaisseurs, quel que soit le profil réel du gel, il est décomposable en modes de Fourier qui sont tous indépendants. Il suffit qu'une seule de ces composantes soit instable pour que la totalité du système soit instable. Les trois ingrédients principaux de ce modèle pour expliquer la brisure de symétrie et qui seront développés plus avant par la suite sont :

- L'existence d'une contrainte latérale, conséquence de la surface courbée du substrat. Comme le gel est créé de façon continue à la surface de la bille (à $r = r_0$), les parties préalablement formées sont constamment repoussées ($r > r_0$) et sont donc étirées d'un facteur r/r_0 (>1)
- La concentration de la contrainte latérale : le gel d'actine autour de la bille étant en équilibre mécanique, la tension intégrée sur l'épaisseur du gel doit être constante le long de la surface de la bille. Si l'épaisseur du gel est plus faible dans une région, celle-ci devra

État initial symétrique



Application d'une perturbation périodique

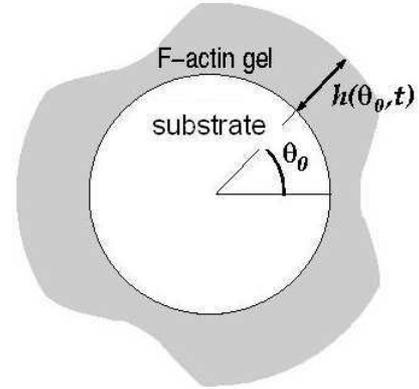


FIG. II.9: Application d'une perturbation de l'épaisseur du gel d'actine pour l'étude de la nouvelle répartition des contraintes dans le gel. $\sigma_{\perp\perp}$ représente la contrainte latérale ressentie dans le gel et h l'épaisseur du gel. La contrainte $\sigma_{\perp\perp}$ est à l'origine du mécanisme de brisure de symétrie dans ce modèle. [Sekimoto, 2004]

supporter une contrainte plus importante afin de soutenir la même tension intégrée.

- Accélération de la dissociation de l'actine à la surface externe du gel sous l'effet des contraintes latérales. Cela suppose un couplage entre la mécanique et la chimie. De manière identique à celle du modèle à une dimension exposé paragraphe II.1.2, on peut penser les contraintes latérales influent sur la dissociation des points de réticulations qui lient les filaments d'actine entre eux.

Ces trois ingrédients constituent une boucle de rétroaction positive qui mène à une instabilité de la forme symétrique du gel en croissance.

Les détails du modèle et des calculs qui vont être présentés par la suite ont fait l'objet d'une publication qui est jointe à la fin de cette partie.

II.3.1.1 Distribution des contraintes dans un gel symétrique

On suppose que le gel a polymérisé de façon homogène autour d'une bille ou d'un cylindre de rayon r_0 , jusqu'à atteindre une épaisseur h , entourant ainsi le substrat et adoptant sa symétrie. Comme cela a déjà été noté plus haut, le gel initialement formé en r_0 est constamment repoussé, de sorte que quand il a atteint un rayon r , il a été étiré d'un facteur r/r_0 par rapport à son état initial. Pour connaître la contrainte élastique dans la direction latérale

$\sigma_{\perp\perp}$, on utilise le « modèle de superposition d'élastiques » [Noireaux, 2000 ; Gerbal, 2000 ; Landau, 1967] qui a été décrit au chapitre I.3.4.3 : Le gel d'actine est vu comme un empilement de couches élastiques. Le gel créé en r_0 n'est pas étiré, il n'y a donc pas contrainte latérale $\sigma_{\perp\perp}|_{r=r_0} = 0$. Cette couche est ensuite repoussée vers l'extérieur, ce qui augmente sa circonférence et induit l'apparition de contraintes latérales [Gerbal, 2000],

$$\sigma_{\perp\perp}|_r = B \frac{r - r_0}{r_0}$$

Où B est le module d'Young du gel.

En particulier, à la surface externe où le gel a une épaisseur h , on a $\sigma_{\perp\perp}|_{r_0+h} = B \frac{h}{r_0}$.

Notons que l'approximation actuelle ignore la déformation radiale due à l'étirement latéral. Bien que ceci n'ait aucune justification pour des gels d'actine, les résultats principaux du modèle actuel ne dépendent pas de cette propriété. Des calculs plus poussés confirment la validité de cette approximation [Sekimoto, 2001].

La composante de cisaillement du stress $\sigma_{r\perp}$ s'annule en tout point pour des raisons de symétrie : $\sigma_{r\perp} = 0$

L'équilibre des forces radiales, dans le cas d'une surface cylindrique, implique que la contrainte radiale σ_{rr} vérifie au rayon r l'équation :

$$\frac{\partial}{\partial r}(r\sigma_{rr}) - \sigma_{\perp\perp} = 0$$

Comme aucune force extérieure n'est appliquée sur le gel, la contrainte normale s'annule au niveau de la surface externe du gel : $\sigma_{rr}|_{r_0+h} = 0$. Ainsi, la contrainte radiale $\sigma_{rr}|_{r_0}$ qu'exerce le gel sur le substrat peut être calculée en fonction de la contrainte latérale $\sigma_{\perp\perp}$ en intégrant l'équation précédente entre $r = r_0$ et $r = r_0 + h$. On obtient :

$$\sigma_{rr}|_{r_0} = -\frac{T}{r_0} \text{ avec } T = \int_{r_0}^{r_0+h} \sigma_{\perp\perp} dr$$

Dans le cas d'un cylindre on obtient donc $\sigma_{rr}|_{r_0} = -Bh/(2r_0)$. On notera que dans le cas d'un substrat sphérique, le calcul est plus complexe mais σ_{rr} s'exprime également en fonction de $\sigma_{\perp\perp}$.

II.3.1.2 Concentration des contraintes latérales dans un gel d'épaisseur inhomogène

Dans cette partie, nous regardons la redistribution des contraintes dans le gel lorsque de petites perturbations sont appliquées au profil extérieur du gel. On regarde comment le système réagit lorsque l'épaisseur du gel n'est pas identique partout. Le processus s'effectue

en deux étapes :

- 1) le profil du gel est légèrement perturbé par rapport à son épaisseur moyenne h^* . A cette étape, le gel n'est pas autorisé à relaxer, il est maintenu immobile jusqu'à la seconde étape.
- 2) Le gel relaxe jusqu'à ce qu'il atteigne un nouvel état d'équilibre mécanique. Il faut alors calculer la nouvelle distribution des contraintes.

Il faut bien souligner que les différentes épaisseurs de gel que l'on a à la fin de la première étape n'ont pas pour origine une compression plus ou moins importante du gel. Des morceaux de gel ont juste été artificiellement enlevés à certains endroits le long du profil de sorte que l'épaisseur $h(\hat{\omega})$ soit différente suivant la direction $\hat{\omega}$ que l'on regarde.

Comme il n'y a pas de forces externes qui s'appliquent sur la surface externe du système, on a les conditions aux limites :

$$\sigma_{rr} \Big|_{r_0+h} = \sigma_{r\perp} \Big|_{r_0+h} = 0$$

Dans de telles conditions, une fois le nouvel équilibre atteint, le stress latéral $\sigma_{\perp\perp}$ est augmenté dans les régions où le gel est le plus fin, c'est à dire dans les orientations $\hat{\omega}$ où $h(\hat{\omega}) < h^*$.

L'analyse directe à trois dimensions pour une distribution $h(\hat{\omega})$ de l'épaisseur est difficile à cause du caractère tensoriel du stress quand on est à trois dimensions. On peut éviter ces difficultés par les arguments suivant :

- On se limite aux modulations $h(\hat{\omega}) - h^*$ comparables à l'épaisseur moyenne h^* . En effet, l'expérience nous montre que dans les systèmes où l'on observe des brisures de symétrie, h^*/r_0 est tout au plus égal à 0,2 [Gerbal, 1999]. Le rayon de courbure de la surface externe ($\sim r_0 + h^*$) est dès lors négligeable au regard de telles modulations. On peut donc négliger les effets spécifiquement dus à cette géométrie courbée du substrat. Exception faite que cette courbure est à l'origine des contraintes $\sigma_{\perp\perp}$ dans le gel.

- L'influence de la perturbation du profil est en pratique limitée à une région proche de la surface du gel. Ainsi, si la perturbation est caractérisée par une longueur d'onde λ , alors la région affectée est aussi caractérisée par λ (figure II.10)

Le traitement à deux dimensions se justifie dans une géométrie circulaire (cylindrique) plutôt que dans le cas sphérique réel. On ajoute de plus la condition de glissement du gel à la surface du substrat, cela signifie que le gel n'est pas accroché à la bille. Cette dernière hypothèse permet de voir comment les contraintes sont redistribuées lors du retour à l'équilibre mécanique.

On considère maintenant une épaisseur de gel qui croît autour d'un cercle de rayon r_0 . A

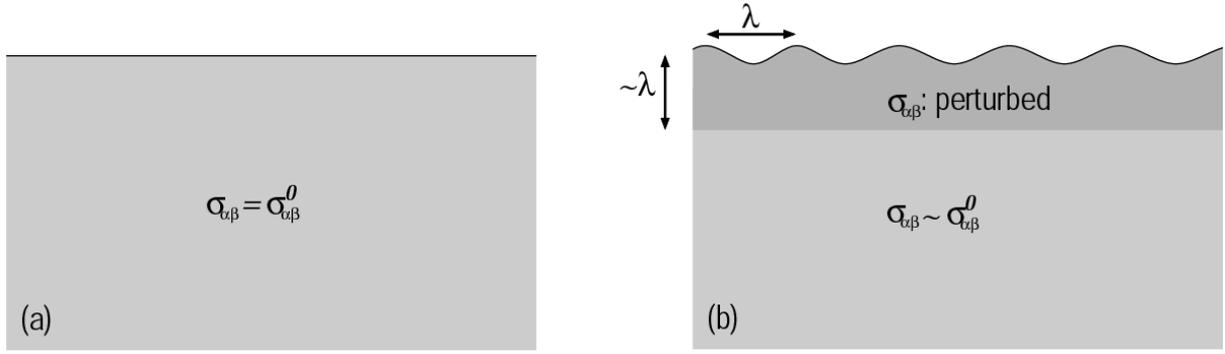


FIG. II.10: Représentation schématique de la surface externe du gel : (a) avant perturbation et (b) après perturbation. La perturbation du profil de la surface avec une longueur caractéristique λ affectera le profil de distribution du stress uniquement sur une mince couche d'épaisseur λ

deux dimensions, on représente l'épaisseur du gel par $h(\theta_0)$ en fonction de θ_0 qui varie de $0 \leq \theta_0 \leq 2\pi$ au lieu de $h(\hat{\omega})$ précédemment. Notons que $h(\theta_0)$ est défini avant le rétablissement de la balance des contraintes. La composante latérale de la contrainte précédemment notée par l'indice \perp correspond maintenant à la direction azimutale et l'indice θ est utilisé pour la désigner. Ainsi, $\sigma_{r\perp}$ devient $\sigma_{r\theta}$, et $\sigma_{\perp\perp}$ devient $\sigma_{\theta\theta}$. Pour de petites perturbations de l'épaisseur, $|h(\theta_0) - h^*|/h^* \ll 1$, une analyse linéaire est possible. Le profil considéré est du type :

$$h(\theta_0) = h^* [1 + \varepsilon_q \cos(q\theta_0)]$$

où q représente le nombre d'ondulations du profil et $|\varepsilon_q| \ll 1$. La longueur d'onde caractéristique d'un mode q est $2\pi r_0/q$, et comme les modulations intéressantes sont celles qui sont de l'ordre de la l'épaisseur du gel, on a une limitation à $q \approx 2\pi r_0/h^*$.

A la surface du substrat, les contraintes de cisaillement sont négligeables et la condition limite de glissement du gel nous permet d'écrire que la contrainte de cisaillement est nulle en $r=r_0$: $\sigma_{r\theta}|_{r_0} = 0$. Le cisaillement entre les différentes couches du gel est également négligé. En utilisant toutes les hypothèses qui viennent d'être énumérées, il est possible de faire le calcul de la distribution des contraintes dans le gel et notamment pour les composantes qui nous intéressent plus particulièrement, c'est à dire la contrainte radiale au niveau du substrat $-\sigma_{rr}|_{r_0}$ et la contrainte latérale à la surface externe du gel $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h}$. Le résultat de ce calcul est :

$$\begin{aligned} \sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h} - (\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h})_{\varepsilon_q=0} &= -\frac{B\chi}{2+\chi} \varepsilon_q \cos(q\theta_0) + o(\varepsilon_q), \\ \sigma_{rr}|_{r_0} - (\sigma_{rr}|_{r_0})_{\varepsilon_q=0} &= o(\varepsilon_q^2) \text{ avec } \chi \equiv h^*/r_0 \end{aligned}$$

Les termes entre parenthèses indicés par $\varepsilon_q = 0$ correspondent aux termes sans perturbation $(\sigma_{\theta\theta} |_{r_0+h})_{\varepsilon_q=0} = B\chi$ et $(\sigma_{rr} |_{r_0})_{\varepsilon_q=0} = \frac{B}{2}\chi$

La contrainte tangentielle est plus forte dans les zones où le gel est le plus fin. Si à ces endroits, les points de réticulation ne peuvent pas supporter le surcroît de tension, alors cette concentration de contraintes va mener à l'apparition de fractures dans le gel.

II.3.1.3 Couplage mécano-chimique : croissance et dissociation d'un gel sous contrainte

L'intérêt se porte maintenant sur l'évolution dans le temps de l'épaisseur du gel, $h(\theta_0, t)$ représente l'épaisseur du gel au temps t et dans la direction θ_0 . Un raisonnement similaire à celui du modèle élastique [Prost, 2002] (cf. I.3.4.3) est appliqué. L'hypothèse est faite que les événements dominants sont la polymérisation à la surface de la bille (en $r = r_0$) et la dépolymérisation au niveau de la surface externe du gel (en $r = r_0 + h(\theta_0, t)$). La différence est ici que la dissociation du gel est considérée comme étant contrôlée par les contraintes tangentielles ressenties à la surface du gel. On a l'équation d'évolution du profil :

$$\frac{\partial h(\theta_0, t)}{\partial t} = a \left[\bar{k}_p e^{-\sigma_{rr} |_{r_0} c_p} - k_d e^{\sigma_{\theta\theta} |_{r_0+h(\theta_0, t)} c_d} \right]$$

où :

- a est une distance de l'ordre de la taille d'un monomère d'actine,
- c_p et c_d sont des constantes,
- \bar{k}_p est la constante cinétique de polymérisation à la surface de la bille en l'absence de contrainte ($\sigma_{rr} |_{r_0} = 0$), elle dépend de la concentration en monomères d'actine que l'on considère ici comme constante (le système est supposé être dans le régime où la diffusion des monomères d'actine jusqu'à la surface de la bille n'est pas un facteur limitant (cf. I.3.4.3),
- k_d est la constante cinétique de dépolymérisation à la surface du gel en l'absence de contrainte latérale ($\sigma_{\theta\theta} |_{r_0+h(\theta_0, t)} = 0$).

Le terme $-c_p \sigma_{rr} |_{r_0}$ marque l'accroissement de la barrière énergétique à franchir pour insérer un nouveau monomère d'actine à la surface de la bille lorsque la contrainte radiale augmente. Inversement, la dépolymérisation à la surface du gel est facilitée par l'accroissement des contraintes tangentielles, c'est l'idée qu'exprime le terme. On notera que l'on peut assimiler $\sigma_{\theta\theta} |_{r_0+h(\theta_0, t)}$ au stress latéral le long de la surface externe car les corrections sur la déviation de l'angle sont du second ordre entre la direction tangentielle (à trois dimensions) et la direction azimutale (à deux dimensions).

L'évolution de l'équation a une solution connue, qui est l'état stationnaire symétrique $h(\theta_0, t) =$

h^* . Résoudre cette équation pour ce profil symétrique permet d'obtenir une relation entre les différentes constantes, k_d , c_p et c_d qui caractérise le système.

II.3.1.4 Instabilité et brisure de symétrie

A présent un profil de gel perturbé est :

$$h(\theta_0, t) = h^* [1 + \varepsilon_q(t) \cos(q\theta_0)], \text{ avec } q \neq 0$$

En introduisant les expressions des contraintes et dans l'équation , on obtient :

$$\frac{d\varepsilon_q(t)}{dt} = \frac{\varepsilon_q(t)}{\tau_q}, \text{ avec}$$

$$\begin{cases} \tau_q = \tau_0 \frac{\Omega_0}{\Omega_q}, \tau_0 = k_d^{-1} \Omega_0^{-1} r_0 / a \\ \Omega_0 = c_d B e^{c_d B \chi} \left(1 + \frac{c_p}{c_d} \chi\right), \Omega_q = c_d B e^{c_d B \chi} \left(\frac{\chi}{2 + \chi}\right) \end{cases}$$

Comme précédemment $\chi \equiv h^*/r_0$.

Les équations et impliquent que :

- L'état stationnaire symétrique est instable lorsqu'il y a des perturbations locales qui cassent la symétrie, puisque tous les τ_q sont positifs. Même si notre analyse n'est valable que pour des $q \approx 2\pi r_0/h^*$, la présence d'un seul mode q instable est suffisant pour déstabiliser le système. Dans le cas $\tau_0 \ll \tau_q$, cette analyse prévoit qu'un état d'équilibre quasi-symétrique devrait être atteint bien plus tôt que le début de la rupture de symétrie. C'est en effet ce qui est observé.
- Le temps τ_q peut être vu comme le temps caractéristique de croissance de l'instabilité. A partir de l'équation, on remarque que ce temps caractéristique est proportionnel au rayon r_0 du substrat utilisé (si les autres paramètres sont fixes) :

$$\frac{\tau_q}{k_d^{-1}} = \Omega_q^{-1} r_0 / a$$

,

Ω_q^{-1} est sans dimension mais il dépend des propriétés du gel (par son module d'Young) et des conditions du milieu (par les constantes des cinétiques de réaction). Cette dépendance linéaire du temps de brisure de symétrie avec le rayon des billes a été expérimentalement observée par A. Bernheim lors d'une étude utilisant un milieu de protéines purifiées (cf. figure I.31 paragraphe I.3.4.4) [Bernheim, 2002].

II.3.2 Études des modes de Fourier et limitations expérimentales

Nous avons regardé s'il était possible de trouver un ou plusieurs modes de Fourier dominant dans les expériences où on observe une brisure de symétrie du gel. Cela est le cas lorsqu'on utilise des billes recouvertes de VCA que l'on met dans des extraits de protéines purifiées [Loisel, 1999] (figure II.11)

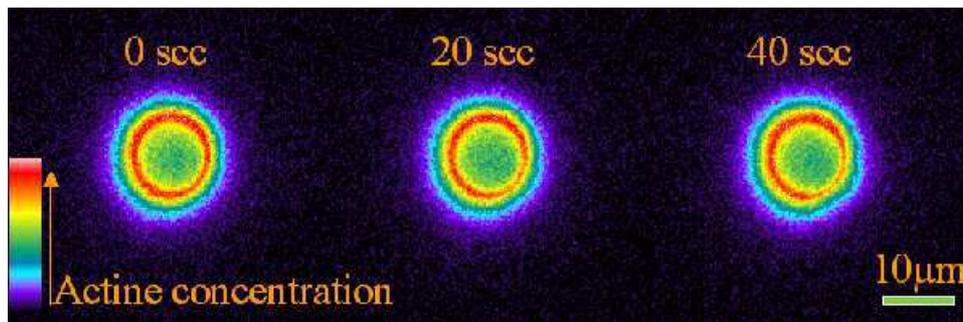


FIG. II.11: L'actine est recrutée à la surface de la bille. On peut voir sur cette séquence d'images le gel perdre son caractère isotrope. Le résultat de ce processus est la mise en mouvement de la bille.

Nous avons dans un premier temps extrait le profil du contour externe du gel au cours du temps en effectuant un seuillage sur l'intensité de fluorescence émise par le gel (figure II.12).

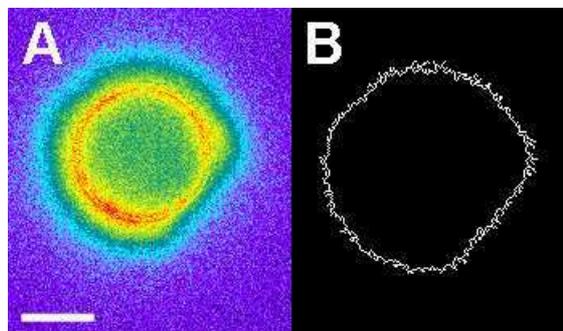


FIG. II.12: (A) En fluorescence, la bille entourée d'un gel d'actine (les couleurs sont artificielles, elles sont fonction de l'intensité de fluorescence émise par l'actine). (B) Par seuillage sur l'intensité de fluorescence, on isole le contour du gel. Barre $3\mu\text{m}$

Nous avons ensuite traité ces contours à l'aide d'un logiciel qui détermine le point des différents modes de Fourier qui décrivent le contour d'un objet. Ce logiciel a été initialement conçu au laboratoire par Jacques Pécraux pour étudier les fluctuations de la membrane

d'une vésicule lipidique [Pécéréaux, 2004]. Ce logiciel est donc optimisé pour l'étude d'objets quasi-sphérique, ce qui correspond également à notre cas.

Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer un mode de Fourier dominant qui caractériserait la fracture du gel à l'origine de l'instabilité qui conduit à la brisure de symétrie. Les raisons peuvent être multiples et notamment à une résolution trop faible sur le contour de la goutte. En effet, le fait de déterminer le profil du gel à partir de l'intensité de fluorescence émise par l'actine introduit un bruit important sur la détermination du contour du gel. Si le mode de fourrier à l'origine de l'instabilité est de taille inférieure à la résolution que nous avons sur le profil, celui-ci ne pourra pas être observé.

II.3.3 Conclusion

Ce modèle est le premier à mettre en lumière le rôle fondamental que peuvent jouer les contraintes tangentielles dans le mécanisme de brisure de symétrie, alors que les précédents modèles mettaient essentiellement l'accent sur l'influence de la contrainte radiale sur les cinétiques de polymérisation de l'actine. Il souligne également la grande instabilité du système lorsque le gel est réparti de manière homogène autour de la bille. La concentration des contraintes aux endroits où le gel est le plus mince fait que la moindre inhomogénéité va être amplifiée jusqu'à aboutir à la formation d'une comète.

Expérimentalement, on observe (suivant les conditions dans lesquelles nous travaillons) que soit le gel fini par « casser » et la bille se met en mouvement, soit il croît de manière isotrope jusqu'à atteindre un état stationnaire. Ce dernier cas est celui observé le plus fréquemment quand on utilise des extraits cellulaires. Les instabilités prévues par le modèle sont influencées par la nature du gel (module d'Young), or les extraits cellulaires contiennent un grand nombre de protéines réticulant les filaments d'actine, ce qui influe sur la valeur du module élastique du gel, de sorte que les contraintes tangentielles qui tirent sur ce gel ne sont jamais suffisantes pour créer des fractures au sein du gel. Le modèle utilise également une hypothèse de glissement du gel à la surface de la bille ; dans la réalité les filaments d'actine sont attachés de manière transitoire à la bille. Ces liens entre le réseau d'actine et la bille font qu'en cas de défaut dans le gel, la relaxation des contraintes ne se fera pas sur la totalité du gel mais sur une région plus restreinte. Cela a pour effet de rendre le gel moins instable que ne le prévoit le modèle. Cependant, la nature du gel semble être l'élément le plus important qui détermine le comportement du gel. En effet, lorsque l'on utilise le cocktail de protéines purifiées à la place des extraits cellulaires on change les propriétés du gel formé, or dans ce cas de figure, le gel d'actine fini toujours par former une comète qui propulse la bille.

II.4 Conclusion

Au cours de nos études sur la dynamique de polymérisation d'un gel d'actine autour d'une sphère, nous avons constaté combien celle-ci était sensible aux conditions expérimentales. Cette extrême variabilité de comportement ne nous a pas permis de déterminer les corrélations entre la cinétique de croissance du gel et la survenue d'une brisure de symétrie dans le gel. Il ne nous est donc pas possible ici de dire dans quelle mesure la dynamique d'assemblage (et de désassemblage) des réseaux d'actine participe à la polarisation du système (que se soit dans le cas des systèmes artificiels ou bien *in vivo*). En revanche, le modèle à deux dimensions met en évidence l'importance des propriétés mécaniques du gel d'actine pour la survenue d'une fracture du gel. En effet, le comportement élastique du réseau d'actine fait que la présence d'une inhomogénéité de la symétrie sphérique du gel autour de la bille rend le système instable et conduit à la formation d'une comète d'actine. La module élastique du gel couplé à la géométrie du substrat impose le temps au bout duquel survient la brisure de symétrie. Il est vraisemblable que la cellule utilise ce type de mécanisme pour favoriser la formation de structures polarisées.

Article : "Role of tensile stress in actin gels and a symmetry-breaking instability"

Role of tensile stress in actin gels and a symmetry-breaking instability

K. Sekimoto^a, J. Prost^b, F. Jülicher^c, H. Boukellal, and A. Bernheim-Grosswasser^d

Physico-Chimie, UMR168 Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

Received 16 July 2003 /

Published online: 23 March 2004 – © EDP Sciences / Società Italiana di Fisica / Springer-Verlag 2004

Abstract. It has been observed experimentally that the actin gel grown from spherical beads coated with polymerization enzymes spontaneously breaks the symmetry of its spherical shape, and yields a “comet” pushing the bead forward. We propose a mechano-chemical coupling mechanism for the initialization of this symmetry breaking. Key assumptions are that the dissociation of the gel takes place mostly in the region of the external surface, and that the rates of the dissociation depend on the tensile stress in the gel. We analyze a simplified two-dimensional model with a circular substrate. Our analysis shows that the symmetric steady state is always unstable against the inhomogeneous modulation of the thickness of the gel layer, for any radius of the circular substrate. We argue that this model represents the essential feature of three-dimensional systems for a certain range of characteristic lengths of the modulation. The characteristic time of the symmetry-breaking process in our model depends linearly on the radius of curvature of the substrate surface, which is consistent with experimental results, using spherical latex beads as substrate. Our analysis of the symmetry-breaking phenomenon demonstrates aspects of mechano-chemical couplings that should be working *in vivo* as well as *in vitro*.

PACS. 87.17.Jj Cell locomotion; chemotaxis and related directed motion – 87.15.Rn Reactions and kinetics; polymerization – 62.40.+i Anelasticity, internal friction, stress relaxation, and mechanical resonances

1 Introduction

Polymerization of actin is one of the main mechanisms responsible for cellular motility. Filaments of F-actin are polymerized on the cytoplasmic side of a cellular membrane with the barbed ends oriented towards the surface of the membrane. The branching of the actin filaments takes place mainly in the vicinity of the surface. The resulting branched F-actin filaments take the form of a soft elastic solid [1], which we call an actin gel or a gel, simply. This actin gel pushes the cellular membrane outwards. Polymerization of actin gels is also a locomotive mechanism for intracellular bacteria like *Listeria monocytogenes*, and perhaps also for the endosomes and lysosomes [2]. In these cases, the gel is grown in form of a comet. This

comet pushes the bacterium forward. For the purpose of understanding this mechanism of motility, various experimental model systems have been developed using both biochemical and biophysical approaches.

Biochemical approaches have isolated the basic cytoplasmic ingredients needed for the motility of *Listeria monocytogenes* [3]: 1) actin and ATP for the formation of F-actin filaments; 2) Arp2/3 as the cross-linker and/or the nucleator of the F-actin growth (*i.e.*, the precise role is still under debate); 3) ADF as the depolymerization factor at the pointed end of F-actin; 4) the capping protein; 5) a bacterial protein called ActA expressed on the surface of *Listeria* which is necessary for inducing polymerization from the surface. These ingredients constitute a model cytoplasm for the motility.

Biophysical approaches have taken the *Listeria* as a model system of cellular motility. Furthermore, a biomimetic *in vitro* system of the bacterial motility has been introduced. This system consists of a spherical latex bead, coated by the enzymatic protein complexes, ActA [4,5], or a fragment (called the VCA domain) of its homologue from human cells, WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein) [6,7]. The cytoplasm has also been replaced by the reconstituted cytoplasm [7]. Despite the

^a Present address: Université Louis Pasteur, 3 rue de l'Université, 67084 Strasbourg, France; e-mail: sekimoto@ldfc.u-strasbg.fr.

^b Also at ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France.

^c Present address: Max Planck Institut für Physik komplexer Systeme, Nöthnitzer Str. 38, 01187 Dresden, Germany.

^d Present address: Chemical Engineering Department, Ben-Gurion University, P.O. Box 653, 84105 Beer-Sheva, Israel.

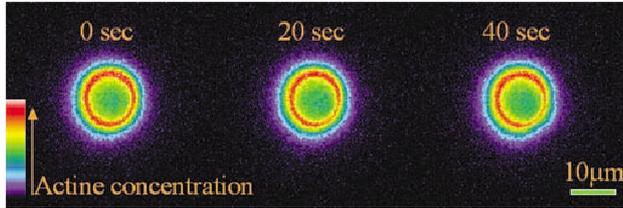


Fig. 1. Experimentally observed time sequence of the actin gel grown around a spherical latex bead. The diameter of the bead is $10 \mu\text{m}$. The bead is coated with a fragment of WASP, and it is placed in a reconstituted solvent as described in the text. The actin monomers in the gel is visible by a fluorescent marker. The observation started at $t = 0$ after several tens of seconds when gel has started to grow.

spherical form of the bead, the gel has grown in shape of a comet, like the bacteria *Listeria* (see for example Fig. 2 of [6]). Figure 1 shows the initial stage of the creation of the comet, observed using fluorescent probe attached to actin monomers. This process bares the signature of a spontaneous symmetry breaking, which is the subject of the present paper. The phenomenon of the symmetry breaking is relevant to some biological systems of sub-cellular level. For instance, the endosomes, which consist of spherical soft substrates (liquid vesicles), grow a comet [2]. Also, the motility of a mutant *Listeria*, which moves preferentially in lateral directions [8] grows the actin gel by breaking its cylindrical symmetry. Our principal aim is to assess, through the study of the symmetry breaking, the relevance of the elastic aspects to the biological motilities based on the polymerization of protein filaments, and to provide for several basic ingredients related to the mechano-chemical coupling. The three ingredients essential for explaining the symmetry breaking are (details will be given in Sects. 2–4):

- i) *The creation of a tensile stress due to the curvature of the substrate surface* (Sect. 2).
As the gel is continuously created at the bead surface (at radius, $r = r_0$), the part that has been already formed is continuously pushed outwards ($r > r_0$). Since the perimeter ($2\pi r$) increases as r , and since the surface has a closed topology, the gel is stretched by the ratio, $r/r_0 (> 1)$.
- ii) *The concentration of the tensile stress by a geometrical effect* (Sect. 3).
The gel layer around a bead is in mechanical equilibrium, so that the integrated tension across the layer thickness of the gel must be constant along the surface of the bead. In particular, if the thickness is locally thinner, such a region must bear a stronger tension in order to support the same integrated tension.
- iii) *The acceleration of dissociation of the gel under tensile stress* (Sect. 4).

We suppose that, under tensile stress, the gel dissociation is accelerated through the mechano-chemical coupling. This dissociation may be either through the unbinding of the branching points along actin filaments, or through the depolymerization of actin filaments.

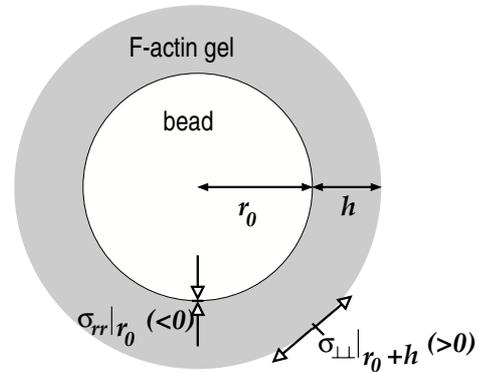


Fig. 2. The cross-section of the F-actin gel around a bead. The relevant stress components in the gel are schematically shown. The gel occupies the space between the radii $r = r_0$ and $r = r_0 + h$. The compressive component of the stress at the substrate surface ($r = r_0$), $\sigma_{rr}|_{r_0}$, and the tensile component at the outer surface ($r = r_0 + h$), $\sigma_{\perp\perp}|_{r_0+h}$, are indicated by the pairs of oppositely oriented open arrows. In this symmetric state, the tensile component at the substrate surface, $\sigma_{\perp\perp}|_{r_0}$, as well as the normal compressive component at the outer surface, $\sigma_{rr}|_{r_0+h}$, vanish.

These three ingredients i)-iii) constitute a positive feedback loop leading to an instability of the symmetric shape of the growing gel. This will be described in Section 5.1. In short, the region of gel with smaller thickness becomes preferentially dissociated due to the higher tensile stress, implying further thinning of that region.

All symmetry-breaking models [9,10] take the mechano-chemical coupling into account. Previous models have focused their attention on the compressive force acting on the actin filaments at the polymerization sites, that is on the substrate surface. Our analysis takes into account the global stress distribution. Of particular importance is the tensile stress generated at the outer surface of the gel. Indeed, on general grounds, the depolymerization rate must be an increasing function of the tensile stress. We show in the following that it leads inevitably to symmetry breaking. In the discussion section (Sect. 6), after a brief summary, we compare, in more details our analysis with the existing ones, and suggest experiments designed for distinguishing between the different possibilities.

2 Distribution of stress within the gel with symmetric shapes

Suppose that a gel has been polymerized steadily from a substrate surface of either spherical or cylindrical shape with radius r_0 , until the gel forms a layer of a thickness h , enclosing the substrate surface and keeping its symmetry (see, Fig. 2). As already noted, the part of the gel that has been formed has been continuously pushed outwards. An element of the gel at radius r is then stretched by r/r_0 times relative to the native state of polymerization.

To know the tensile stress in the lateral direction, $\sigma_{\perp\perp}$, let us use the “stacked rubber band model” [5,11,12]: A

freshly cross-linked gel at the latex surface ($r = r_0$) is unstretched and has no lateral stresses, $\sigma_{\perp\perp}|_{r=r_0} = 0$. As the layer is pushed outward, its circumference increases which introduces a lateral stress [11],

$$\sigma_{\perp\perp}|_r = B \frac{r - r_0}{r_0}, \quad (1)$$

with B being the Young modulus. In particular, when the thickness of the gel layer is h , the tangential stress at the outer surface of the gel is

$$\sigma_{\perp\perp}|_{r_0+h} = B \frac{h}{r_0}. \quad (2)$$

We remark that the present approximation ignores the radial deformation due to the lateral stretching, in other words, it assumes a vanishing Poisson ratio. Although this has no justification for actin gels, the main results of the present paper do not depend on this property. More refined calculation confirm the validity of this statement [13].

The shear component of the stress $\sigma_{r\perp}$ vanishes everywhere, for symmetry reasons:

$$\sigma_{r\perp} = 0.$$

Radial force balance requires that the radial stress, σ_{rr} , at radius r obeys the following equations:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \sigma_{rr}) - \frac{2}{r} \sigma_{\perp\perp} = 0 \quad (3)$$

for a spherical surface ([5], see App. A), or

$$\frac{\partial}{\partial r} (r \sigma_{rr}) - \sigma_{\perp\perp} = 0 \quad (4)$$

for a cylindrical surface [11]. Since no external force is applied on the outer surface of the gel layer, the normal stress must vanish:

$$\sigma_{rr}|_{r_0+h} = 0. \quad (5)$$

Under this condition, the normal stress at the substrate surface, $\sigma_{rr}|_{r_0}$, can be calculated in terms of the lateral stress, $\sigma_{\perp\perp}$. In the case of cylindrical substrate, we integrate equation (4) from $r = r_0$ to $r = r_0 + h$, and have

$$\sigma_{rr}|_{r_0} = -\frac{T}{r_0}, \quad (6)$$

where T is the *integrated tension* across the symmetric gel slab, defined by

$$T = \int_{r_0}^{r_0+h} \sigma_{\perp\perp} dr. \quad (7)$$

Using equation (1) we find $T = Bh^2/(2r_0)$, and thus $\sigma_{rr}|_{r_0} = -Bh^2/(2r_0^2)$. For the spherical substrate, the relation is not as simple as the cylindrical case. Still, σ_{rr} is given as an integration of $\sigma_{\perp\perp}$.

3 Concentration of the tensile stress under a modulated surface profile

In this section, we consider how small perturbations to the surface profile of the gel layer lead to the redistribution of the stress components within the gel layer. We introduce the function representing the thickness of the gel layer, $h(\hat{\omega})$, with the variable $\hat{\omega}$ representing the orientation from the origin. A spherically symmetric gel layer corresponds to the constant function, $h(\hat{\omega}) = h^*$, with a constant thickness h^* .

The analysis of the thickness perturbation is done in the following two steps: In the first step, we suppose that this function, $h(\hat{\omega})$, is slightly perturbed from a constant function, but we still do not allow for the displacement of the gel. In the second step, we let the gel layer relax until it re-establishes the mechanical balance. We calculate how the stress in the gel is distributed in this new balanced state. To avoid any confusion, we stress that, the perturbations ($h(\hat{\omega}) - h^* \neq 0$) at the end of the first step does *not* imply the swelling or deswelling of the gel layer. The perturbation rather implies that there is more or less material of gel along the direction $\hat{\omega}$ than the average. (It could be due to the enhanced/depressed polymerization, or, to the depressed/enhanced dissociation of the gel along this direction.) As we discuss a situation such that there is no external force on the outer surface, we require stress-free conditions on the outer surface of the gel layer.

$$\sigma_{rr}|_{r_0+h} = \sigma_{r\perp}|_{r_0+h} = 0. \quad (8)$$

What we demonstrate is that, under the above conditions, the tensile stress $\sigma_{\perp\perp}$ under the re-established mechanical balance is locally enhanced in the thinned region of the gel layer, that is, in the zone of the orientation $\hat{\omega}$ that satisfies $h(\hat{\omega}) < h^*$. On the one hand, the physical origin of the stress concentration is quite simple and universal. In fact the authors have noticed, after completion of the present work, that essentially the same mechanism of stress concentration has been discussed long before in the context of crystal growth under stress (see, for example, a concise review on the related history in the literature [14]). In Appendix B we describe the basic mechanism of this phenomenon by using an illustrating example in a very simple geometry. On the other hand, the direct analysis of the present case with the distributed thickness $h(\hat{\omega})$ is difficult, because of the three spatial dimensionalities and the tensorial character of the stress associated to this space. We can avoid, however, this difficulty by the following lines of reasoning.

- 1) We limit our concern to the modulations $h(\hat{\omega}) - h^*$ whose characteristic wavelengths are comparable to the average thickness, h^* . Experimentally, h^*/r_0 is at most about 0.2 [15]. The radius of curvature of the outer surface ($\simeq r_0 + h^*$) is, therefore, not appreciable in view of such short wavelength of modulation. We may then ignore the effect of a specific curved geometry of the substrate surface *except for* the fact that the curvature gives rise to the lateral tension $\sigma_{\perp\perp}$ in the gel layer.

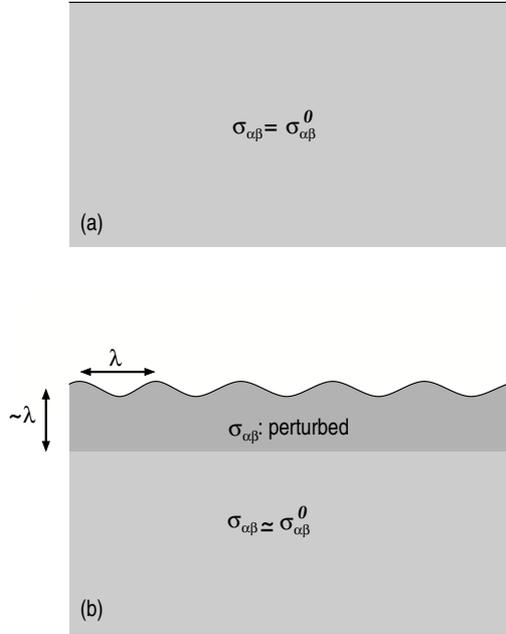


Fig. 3. Schematic representation of the outer gel surface before (a) and after (b) perturbation. A perturbation of the surface profile with characteristic length λ affects the stress profile only within a “skin layer” of thickness λ .

- 2) We notice the following fact: As far as the stress distribution inside the gel layer is concerned, the influence of the surface profile perturbation is practically limited to a region near the outer surface (see, Fig. 3). More precisely, if the perturbation is characterized by a wavelength, λ , then the thickness of the disturbed region is also characterized by λ . (The boundary condition far from this layer is therefore irrelevant to this disturbance.) For detailed arguments, see Appendix C.
- 3) With our wavelength choice in 1), and with the fact just mentioned above 2), we can justify the study of a) a two-dimensional circular geometry rather than the real spherical one, with b) a “slip” boundary condition on the substrate surface, to see how the stress in the actual three-dimensional case is distributed after the re-establishment of the mechanical balance. Moreover, c) the neglect of the shear stress components within the gel layer is justifiable for the experimentally realized situation where the mean thickness of the gel layer h^* is much smaller than the radius r_0 . We will formulate these assumptions in more details below.

- a) *We consider the gel layer grown around a two-dimensional circle of radius r_0 .*
In two dimension, we represent the thickness of the gel layer by $h(\theta_0)$ as a function of the angle θ_0 with $0 \leq \theta_0 < 2\pi$, instead of $h(\hat{\omega})$ above. (See, Fig. 4: $h(\theta_0)$ is defined *before* the re-establishment of the mechanical balance.) The lateral components of the stress, which we have denoted symbolically by \perp , corresponds now to the azimuthal direction. We then use the suffix θ in place of \perp hereafter. For example, we write $\sigma_{r\theta}$ for

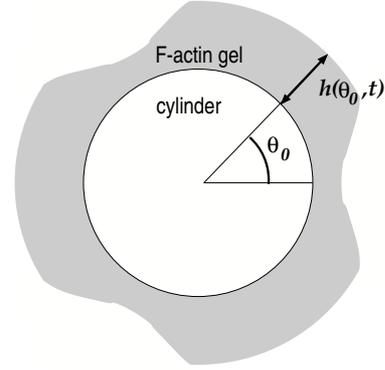


Fig. 4. Definition of the angular variable θ_0 and the height function $h(\theta_0, t)$ of a gel with modulated thickness due to depolymerization before an elastic deformation re-establishes mechanical equilibrium.

$\sigma_{r\perp}$, and $\sigma_{\theta\theta}$ instead of $\sigma_{\perp\perp}$. For small perturbations of the thickness, $|h(\theta_0) - h^*|/h^* \ll 1$, we may use the linear analysis. Then it suffices to consider the form

$$h(\theta_0) = h^* [1 + \epsilon_q \cos(q\theta_0)], \quad (9)$$

where the integer q indicates the number of nodes of the spatial undulations, and ϵ_q is supposed to be small ($|\epsilon_q| \ll 1$). The characteristic wavelength for the q -th mode is about $2\pi r_0/q$, and the restriction (1) is represented as $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$. (Remark: Besides our purpose of analysis, the two-dimensional geometry applies rather directly to a *Listeria* mutant [8] mentioned in Sect. 1. This mutant moves preferentially in lateral directions, breaking its cylindrical symmetry.)

- b) *On the substrate surface ($r = r_0$), the shear stress is negligible.*

The slip boundary condition for the shear stress is written as

$$\sigma_{r\theta}|_{r_0} = 0. \quad (10)$$

(Remark: Note that we do not claim this boundary condition to be always realistic. We rather use this condition since it is justifiable for the calculation of the stress distribution under the modes of perturbations with $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$: See argument 2) above and App. C for details.)

- c) *The shear stress $\sigma_{r\theta}$ within the gel layer is negligible.*
As mentioned above, the experimental value of h^*/r_0 is $\ll 1$. In such situation we may, in the lowest-order approximation, estimate the magnitude of the shear stress, with a parabolic profile of the shear stress $\sigma_{r\theta}$: $\sigma_{r\theta} = \tilde{\mu}\epsilon_q(r_0 + h - r)(r - r_0)/r_0^2$ for $r_0 \leq r \leq r_0 + h$, which satisfies the boundary conditions, equations (8) and (10). Here, $\tilde{\mu}$ is a constant proportional to the shear modulus μ of the gel. The magnitude of $\sigma_{r\theta}$ is, therefore, at most of the order of $\tilde{\mu}\epsilon_q(h^*/r_0)^2$. We compare this with the change of $\sigma_{\theta\theta}$ due to the perturbations of the thickness, which is of order $\epsilon_q B h^*/r_0$ (see

Eq. (1)). Then $\sigma_{r\theta}$ is smaller than this by a factor of h^*/r_0 , and is therefore negligible.

In Appendix D we show how the stress distribution within the gel is calculated for the model described by a)-c). Below, we show only the results for the tensile stresses $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h}$ at the external gel surface and the normal compression, $-\sigma_{rr}|_{r_0}$ at the substrate surface:

$$\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h} - (\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h})_{\epsilon_q=0} = -\frac{B\chi^2}{2+\chi}\epsilon_q \cos(q\theta_0) + \mathcal{O}(\epsilon_q^2), \quad (11)$$

$$-\sigma_{rr}|_{r_0} - (-\sigma_{rr}|_{r_0})_{\epsilon_q=0} = \mathcal{O}(\epsilon_q^2), \quad (12)$$

with $\chi \equiv h^*/r_0$. The bracketed terms with the subscript $\epsilon_q = 0$ are those terms without perturbation: $(\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h})_{\epsilon_q=0} = B\chi$ and $(-\sigma_{rr}|_{r_0})_{\epsilon_q=0} = \frac{B}{2}\chi^2$ (see Eqs. (2) and (6)). In equation (12), $\mathcal{O}(\epsilon_q^2)$ indicates the terms of at least second order of ϵ_q . Since $\epsilon_q \cos(q\theta_0) = (h(\theta_0) - h^*)/h^*$, the minus sign on the right-hand side of equation (11) implies that the lateral tension is augmented, $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0} > (\sigma_{\theta\theta}|_{r_0})_{\epsilon_q=0}$, in the thinned portion of the layer, $h(\theta_0) < h^*$.

4 Mechano-chemical coupling: Growth and dissociation of gel under stress

In this section, we consider the time evolution of the thickness of the gel layer. We denote the profile of the thickness at the time t as $h(\theta_0, t)$. We are interested in the chemical processes which take place on time scales much larger than the establishment of the mechanical balance within the gel. We suppose that the relevant microscopic chemical processes are the polymerization and branching of the actin filaments to form the gel, and the unbinding of the branching points and/or through the depolymerization of actin filaments to dissociate the gel. We adopt a simplified version of the model proposed previously [15, 5]:

$$\frac{\partial h(\theta_0, t)}{\partial t} = a \left[\bar{k}_p e^{\sigma_{rr}|_{r_0} c_p} - k_d e^{\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)} c_d} \right], \quad (13)$$

where a , \bar{k}_p , k_d , c_p and c_d are positive constants. The prefactor a outside the square bracket on the right-hand side (r.h.s.) is a length of about the size of an actin monomer. This represents the rate of conversion between the chemical processes and the change of the thickness, h . The other parameters are described below.

In the square bracket on the right-hand side (r.h.s.) of equation (13), the first term represents the polymerization at the substrate surface ($r = r_0$). Here, we have introduced the assumption: i) *On the substrate surface, the polymerization is the dominant process.* The pre-exponential factor \bar{k}_p represents the kinetic constants in the absence of compressive stress ($\sigma_{rr}|_{r_0} = 0$). \bar{k}_p depends on the concentration of actin monomers in the solvent. In our analysis we assume this to be constant. The exponential factor represents the fact that the polymerization is decelerated

by the compression, $\sigma_{rr}|_{r_0} (< 0)$. The parameter c_p has been introduced so that $-c_p \sigma_{rr}|_{r_0}$ accounts for the increase in the polymerization potential barrier due to the cost in elastic energy (divided by $k_B T$) to push out the gel layer outward against the compressive stress. We have neglected the dissociation of the gel at the substrate surface. Such process could be easily incorporated in the model [16, 13], but has little effect in our context. In the experiment of the polymerization of microtubules, it has been shown that the negligence of the depolymerization on the growing end (the plus end) is a good approximation [17].

The second term in the square bracket on the r.h.s. of equation (13) represents the gel dissociation. We have introduced the assumption: ii) *The dissociation process is almost localized on the outer surface of the gel at $r = r_0 + h(\theta_0, t)$.* The pre-exponential factor, $-ak_d$, therefore represents the rate of thickness decrease which occurs due to the dissociation of the gel under the stress-free condition, $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)} = 0$. (Remark: Here we can identify $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)}$ as the tensile stress along the tangent of the outer surface, since the correction is of second order of the deviation angle, $|\frac{\partial h}{\partial \theta_0}|/(r_0 + h)$, between the tangential direction and the azimuthal direction.) The exponential factor of this term represents the fact that the dissociation is accelerated by the lateral tensile stress $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)} (> 0)$. The parameter c_d has been introduced so that $c_d \sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)}$ accounts for decrease in the depolymerization potential barrier due to the release of the elastic energy (divided by $k_B T$) when the gel is dissociated under the tensile stress. We have neglected the dissociation of the gel occurring inside the gel. There are good reasons to believe that the gel dissociation is strongly accelerated under tensile stress [16], as compared with spontaneous dissociation under the stress-free condition. In fact, the experiments using the full cell extract as the solvent have shown that the mean thickness of the gel layer around the latex bead is much smaller than the average length of the comet produced by *Listeria* of similar size. It implies that the Boltzmann factor of the form, $e^{c_d \sigma_{\theta\theta}}$, is crucial to determine the dissociation rate. As $\sigma_{\theta\theta}$ is largest on the outer surface of the gel, we suppose that the gel dissociation occurs mostly in the vicinity of the outer surface.

The kinetic equation, equation (13), also assumes the following: iii) *The diffusion of actin monomer is fast enough.* This limits our analysis to a bead radius range smaller than a cross-over size, r_c , separating a stress-governed regime from a diffusion-controlled regime. Indeed, on the substrate surface, the actin gel is formed from the adjunction of actin monomer molecules. And for these molecules to reach the substrate surface, they have to diffuse through the network of the actin gel. Previous experimental and theoretical analysis [5] indicates that, as far as the diameter of the latex bead is less than about $5 \mu\text{m}$, and under physiological concentrations of the actin monomers and of the cross-linker molecules, diffusion does not limit the thickness evolution, $h(\theta_0, t)$.

The evolution equation, equation (13), has a solution corresponding to the symmetric stationary state, $h(\theta_0, t) = h^*$ [5]. If we restrict our analysis to the circularly

symmetric profiles, $h(\theta_0, t) = h(t)$, this solution is *stable*. In fact, substituting the form $h(\theta_0, t) = h^*$ into equation (13), we obtain the equation for $\chi \equiv h^*/r_0$ as

$$\frac{c_p}{c_d} \chi^2 + \chi - \frac{2}{c_d B} \log \left(\frac{\bar{k}_p}{k_d} \right) = 0. \quad (14)$$

This equation has a positive, therefore, physically meaningful, solution for $\bar{k}_p/k_d > 1$. Furthermore, if we substitute the form

$$h(\theta_0, t) = h^* [1 + \epsilon_0(t)], \quad (15)$$

equation (13) reduces, up to linear order in $\epsilon_0(t)$, to the following equation:

$$\frac{d\epsilon_0(t)}{dt} = -\frac{\epsilon_0(t)}{\tau_0}, \quad (16)$$

with $\tau_0 = k_d^{-1} \Omega_0^{-1} r_0/a$,

$$\Omega_0 = c_d B e^{c_d B \chi} \left(1 + \frac{c_p}{c_d} \chi \right). \quad (17)$$

Equation (16) shows, as already mentioned, that the steady-state solution $h(\theta_0, t) = h^*$ is stable with respect to perturbations keeping the overall symmetry. This result is understandable since a radius with $h > h^*$ ($< h^*$) would lead to an increase (decrease) of both $(-\sigma_{rr}|_{r_0})$ and $\sigma_{\perp\perp}|_{r_0+h}$, and these in turn make the r.h.s of equation (13) negative (positive), leading to a decrease (increase) of h toward the stationary value h^* . From equations (14) and (17), χ and τ_0 are functions of three parameters, $c_d B$, $\frac{c_p}{c_d}$, and $\frac{\bar{k}_p}{k_d}$. Note that τ_0 is a few orders of magnitude larger than the microscopic time k_d^{-1} , with r_0/a being of order 10^3 and Ω_0 of order 10.

5 Result

5.1 Symmetry-breaking instability

We now consider symmetry-breaking perturbations and we assume the following form for the gel layer profile:

$$h(\theta_0, t) = h^* [1 + \epsilon_q(t) \cos(q\theta_0)], \quad (18)$$

with $q \neq 0$. Substituting the expressions of the stress components, equations (11) and (12) into equation (13), where ϵ_q is replaced by $\epsilon_q(t)$, we have the following equation up to the linear order of $\epsilon_q(t)$,

$$\frac{d\epsilon_q(t)}{dt} = \frac{\epsilon_q(t)}{\tau_q}, \quad (19)$$

with $\tau_q = \tau_0 \frac{\Omega_0}{\Omega_q}$,

$$\Omega_q = c_d B e^{c_d B \chi} \frac{\chi}{2 + \chi}, \quad (20)$$

where $\chi \equiv h^*/r_0$ as before. (Remember that χ can be expressed in terms of the parameters $c_d B$, $\frac{c_p}{c_d}$, and $\frac{\bar{k}_p}{k_d}$.) Note that since $\Omega_0 \Omega_q \simeq 2/\chi \simeq 10$, $\tau_0 \ll \tau_q$. Equations (19) and (20) imply the following characteristics of the symmetric stationary state $h(\theta_0, t) = h^*$.

- i) *The symmetric stationary state is unstable against perturbations which break the symmetry*, since all τ_q are positive. In fact, the applicability of our model is guaranteed only in the range of q satisfying $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$ (see, Sect. 3). Nevertheless, the presence of an unstable mode is sufficient for the proof of instability. Note also that since $\tau_0 \ll \tau_q$, our analysis predicts that a quasi-symmetric steady state should be reached significantly earlier than the onset of symmetry breaking. This is indeed what is observed.
- ii) *The characteristic time of the instability is proportional to the radius of the substrate if the other parameters are fixed*. It is reasonable to suppose that τ_q represents the characteristic time of the growth of the perturbation. Then, from (19), τ_q is written in a scaling form:

$$\frac{\tau_q}{k_d^{-1}} = \Omega_q^{-1} \frac{r_0}{a}, \quad (21)$$

where k_d^{-1} and a play the role of intrinsic time scale and length scale, respectively. The dimensionless constant of proportionality, Ω_q^{-1} , depends on the properties of the gel and of the solvent through the parameters, $c_d B$, $\frac{c_p}{c_d}$, and $\frac{\bar{k}_p}{k_d}$. Note that, in fact, the quantity τ_q thus defined shows no dependence on q ($\neq 0$), as Ω_q does not. This apparently anomalous behavior should not be taken seriously, because the range of wave number validity of our analysis is limited to $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$.

Quantitatively, we can evaluate the characteristic time τ_q using the experimentally known data in the literature: The stationary velocity v_{gel} at which the gel material moves outward is identified from equation (13) as

$$v_{\text{gel}}/r_0 = k_d(a/r_0) e^{c_d \sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0, t)}} = k_d(a/r_0) e^{c_d B \chi}.$$

Comparing this with the expression of τ_q obtained from equations (20) and (21), $\tau^{-1} = k_d(a/r_0) e^{c_d B \chi} c_d B \chi / (2 + \chi)$, we see that

$$\tau = \frac{r_0}{v_{\text{gel}}} \frac{2 + \chi}{c_d B \chi}. \quad (22)$$

As described in [5], $c_d B \chi$ is the decrease in energy barrier (in units of $k_B T$) in the dissociation of an actin filament under tensile stress, compared to the unstressed case. For the effects described in this manuscript to be observable, this decrease must be of order one. Noting that $\chi \ll 2$, our analysis requires the combination $\tau_q v_{\text{gel}} / (2r_0)$ to be of order one. The experiment gives $\tau_{\text{sym}}/r_0 \simeq 5 \text{ min}/\mu\text{m}$ and $v_{\text{gel}} \simeq 1 \mu\text{m}/\text{min}$ (note that it is the polymerization rate under stress) which leads to $\tau_q v_{\text{gel}} / (2r_0) \simeq 2.5$. This is in the expected range.

5.2 Role of external symmetry-breaking perturbations

In reality, a strictly symmetric substrate, either spherical or cylindrical, is impossible. Also, the chemical properties of the substrate surface are never perfectly homogeneous. A nominally spherical latex bead may contain a weak local deviation of the surface curvature and a weak heterogeneity of the polymerization constant, \bar{k}_p , along the surface. Thus, we should suppose that there are disturbances which break *externally* the symmetry of the system, and modify equation (13) or its linearized form, equation (19). A legitimate question is, therefore, “if and how the above symmetry-breaking *instability* plays a role?” In short, the answer is that, despite these extrinsic factors, the instability mechanism of symmetry breaking manifests itself in the evolution of the gel’s thickness, justifying our comparison with experiments done in the above Section 5.1 We discuss it first in a formal manner, and then in the context of the geometrical and chemical heterogeneities.

Within the linear approximation, the evolution equation, equation (13), is decomposed into the equation for each mode, like equations (16) or (19). In the latter equation the system’s intrinsic heterogeneity may be represented as a small but finite source term, ϵ_q^e ,

$$\frac{d\epsilon_q(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_q}(\epsilon_q(t) + \epsilon_q^e). \quad (23)$$

We can solve this equation with the initial condition $\epsilon_q(0) = 0$:

$$\epsilon_q(t) = \epsilon_q^e \tau (e^{\frac{t}{\tau}} - 1) \simeq \begin{cases} \epsilon_q^e / \tau q t, & \text{for } t < \tau \\ \epsilon_q^e e^{\frac{t}{\tau}}, & \text{for } t > \tau \end{cases}. \quad (24)$$

This shows that, after a time $t \sim$ a few τ , the effect of the non-symmetric disturbance is exponentially amplified ($e^{t/\tau} \gg 1$) by the instability mechanism, while the direct effect of the source is small in the sense that $\epsilon_q^e t \ll 1$ even for $t \simeq$ few τ_q . In this way, the symmetry-breaking mechanism manifests itself as an amplifier of small heterogeneous disturbance in the system, which can be experimentally observable.

Another way to think about the external perturbation is to define the time τ_{Sq} required for developing an ϵ_q of a specified value ϵ_q^S : Equation (24) leads to

$$\tau_{Sq} = \tau_q \ln \left(1 + \frac{\epsilon_q^S}{\epsilon_q^e} \right). \quad (25)$$

Changing the prescribed value ϵ_q^S or the external perturbation ϵ_q^e by orders of magnitude changes τ_S only by a small factor. This tells us that, as already announced, the scaling of the characteristic observable times is essentially given by τ_q . It also tells us that the detailed knowledge of the early dynamics is not essential in the definition of τ_{Sq} provided τ_q is sufficiently larger than τ_0 , so that a quasi-spherical state is obtained before the symmetry-breaking process is observed. We know this to be true both from our analysis and from experiment.

Now we describe how the parameter ϵ_q^e reflects the effect of the heterogeneity of the surface curvature and of the polymerization rate. Under the linear approximation, we only need to consider the profile of the substrate surface which can be described in terms of the radius $r_0(\theta_0)$ as a function of the angle θ_0 : $r_0(\theta_0) = r_0 + \Delta_q^{(\text{geo})} \cos(q\theta_0)$. Additionally, we consider the spatial distribution of the polymerization rate constant \bar{k}_p represented as a function of θ_0 : $\bar{k}_p(\theta_0) = \bar{k}_{p0} + \Delta_q^{(\text{chem})} \cos(q\theta_0)$. $\Delta_q^{(\text{geo})}$ and $\Delta_q^{(\text{chem})}$ characterize the amplitudes of geometrical and chemical perturbations, respectively. The geometric profile $r_0(\theta_0)$ leads to the non-homogeneous curvature $\kappa(\theta_0)$, which has the following form:

$$\kappa(\theta_0) = \frac{1}{r_0} \left[1 + \frac{\Delta_q^{(\text{geo})}}{r_0} (q^2 - 1) \cos(q\theta_0) \right].$$

Along the line of calculation in Appendix D, this expression of the curvature should replace the factor r_0^{-1} in equation (D.7). The normal stress on the substrate surface is therefore given by

$$\sigma_{rr}|_{r_0} = -\kappa(\theta)T. \quad (26)$$

As for the chemical heterogeneity in the polymerization rate, $\bar{k}_p(\theta_0)$ should replace \bar{k}_p in equation (13). In general, these effects can be summarized in the form of $\epsilon_q^e = \beta_q^{(\text{chem})} (\Delta_q^{(\text{chem})} / \bar{k}_p) + \beta_q^{(\text{geo})} (\Delta_q^{(\text{geo})} / r_0)$, with dimensionless numbers $\beta_q^{(\text{chem})}$ and $\beta_q^{(\text{geo})}$. However, if these source terms have existed from the start of polymerization, the expressions of $\beta_q^{(\text{chem})}$ and $\beta_q^{(\text{geo})}$ are complex because in the early stages of the gel growth none of the linear equation is valid. However, as we have already pointed out the exact knowledge of ϵ_q^e is not essential for understanding the main feature of the dynamics if $\tau_0 < \tau_q$. We, therefore, only mention about the restricted case where those heterogeneities are switched on at a certain moment of time after the symmetric steady state has been established. The result then reads

$$\epsilon_q^e = \frac{e^{c_d B \chi}}{\Omega_q \chi} \left(\frac{\Delta_q^{(\text{chem})}}{\bar{k}_p} - \frac{c_p B \chi^2}{2} (q^2 - 1) \frac{\Delta_q^{(\text{geo})}}{r_0} \right). \quad (27)$$

The positive coefficient in front of $\Delta_q^{(\text{chem})}$ reflects the acceleration of the turnover of the gel material where \bar{k}_p is increased, while the minus sign in front of the second term in the bracket reflects the polymerization being slowed down where the surface extrudes, or, where $\kappa(\theta_0) > \frac{1}{r_0}$.

6 Discussion

Our analysis based on gel elasticity leads to the essential prediction that the spherical symmetry is always unstable. The expected scenario is that in a first step a quasi-spherical steady state is reached which should obey the prediction contained in [5] and [18]. Then on a time scale

significantly larger than the characteristic time for reaching the isotropic quasi-steady state, symmetry is broken. In the regime we discuss, governed by elasticity, these two times are predicted to scale like the radius of the bead on which the experiment is conducted. This scaling should be very robust in the elastic regime, since r_0 is the only length scale in the problem. In particular, it should hold for wavelengths larger than those considered here. All these expectations are well born out by experiment [7]. In a number of cases symmetry is not observed to be broken: this may be due to three different causes: 1) the experiment duration might not be long enough for the symmetry-breaking event to take place, 2) the gel/bead friction, considered in Appendix E might further slow down the symmetry-breaking process, 3) the gel might not behave fully elastically at very long time scales. In this latter case, a new time scale would come into play, namely that over which a significant stress may be maintained, and a new calculation should be developed. We discuss various possible improvements to our current analysis in Appendix E.

As explained in this manuscript the main ingredient for the occurrence of symmetry breaking comes from the tensile-stress concentration where the gel thickness is smallest. This feature, added to a stress-dependent depolymerization in the immediate vicinity of the gel outer surface, leads to an absolute instability of the system. This is in contrast with earlier models [9,10] in which symmetry is broken at the polymerizing gel bead surface. Their interpretation is most transparent in the one-dimensional case; consider two opposing sides on which parallel filaments are grown. The force on individual filaments, *i.e.* the ratio of the total force (equal on both sides because of force balance) to the number of supporting filaments, is the key notion. The smaller the number of filaments participating, the slower the effective polymerization rate; it is natural to expect a force dependence and different scenarios have been discussed [9,10] if an unbalance between the two sides arises at some point, it grows since the “weak” side tends to become “weaker”. The two-dimensional version of this mechanism, simulated by van Oudenaarden *et al.* [9] is closely related to simulation and experiments done on the microtubule/centrosome (or microtubule/bead) system. The latter system does not exhibit an instability whereas the first does. The difference in behavior results from the difference in boundary conditions. All these cases do not consider the situation where filaments are cross-linked. Actin gels are cross-linked and we propose that in two and three dimensions these cross-links change profoundly the behavior. Indeed, if the thickness of the gel layer is locally decreased, the compressive stress there, $\sigma_{rr}|_{r_0}$, should either stay constant if full-slip boundary conditions are achieved, or decrease, irrespective of the thinning cause. The lateral displacement of the gel layer along the substrate surface might at most relax some of this local decrease of $\sigma_{rr}|_{r_0}$, but it will never be able to increase it. Thus, the mechanism described [9,10] for non-cross-linked filaments do not apply to gels.

There might be an objection here: admitting that the compressive stresses at the substrate surface can at

most stay constant, would this not decrease the local filament density and therefore increase the compressive force per filament, exactly as proposed by van Oudenaarden *et al.* [9]? We could agree on this point if the rate of branching/cross-linking per filament were to be always constant, as it was assumed in the previous models by van Oudenaarden and Theriot [9] and by Mogilner and Oster [10]. In fact, however, the density of actin filaments on the substrate surface is likely to be insensitive to the lateral stretching of gel. The reason is, as is shortly discussed in Appendix E (item 7), that the growth of the gel proceeds in the way that the tensile stress is almost zero on the substrate surface. Therefore, the frequency of the branching and the resulting density of actin filaments on the surface should be determined by the compressional stress from the gel, which is *unchanged* up to the order of $\epsilon_q(t)$ (the amplitude of the perturbation) and by the density of the enzyme, which is supposed to be uniform on the surface, except in the discussion in Section 5.2. Of course the above argument is justifiable so long as the evolution of the symmetry breaking is not extremely fast compared with the microscopic characteristic time of branching.

A direct experimental assessment of the symmetry-breaking mechanism could involve monitoring simultaneously the depolymerization and the polymerization processes at the outer and inner gel surfaces, respectively. This is not an easy experiment.

In the present paper, we assumed that the degradation of gel occurs mainly through the depolymerization. However, the gel fracture would explain the symmetry breaking: In fact both the depolymerization scenario in our paper and the rupture scenario can be viewed as two extremes of a unified instability model. What is common to both scenarios is that spontaneous degradation of gel from the outer surface is supposed to exist even if there are no stretching stresses. The difference is the spatial patterns with which the symmetry is broken, either a smooth perturbation of the thickness or by a sharp wedge opening in the gel layer. (In the field of polymer physics, it is reminiscent of the two complementary models of microphase separation in diblock copolymers, called the models of strong segregation limit and of weak segregation limit, respectively.) In both cases, the degradation of gel should start from the external surface of the gel where the tensile stress is the strongest. As there are no direct experimental evidences that distinguishes the depolymerization from the rupture upon symmetry breaking, we have taken the former hypothesis to do a concrete analysis. It is also possible that the rupture appears as the late and non-linear stage of symmetry breaking which is initiated by a weak linear instability through inhomogeneous depolymerization.

Both models may explain the apparent absence of the breaking of symmetry around the beads with large diameter: The establishment of an appreciable tensile stress requires long time and thick gel layer for large diameter, as described in the text. Therefore, the diffusion of the monomer components of the gel (actin, Arp2/3 etc.) might become the limiting process of the gel growth [18]. As a result, the gel thickness attain a stationary value

independent of the diameter of the bead, as a balance between the the “evaporation” (spontaneous degradation of gel independent of the tensile stress) from the outer surface and the growth from the inner surface. In the rupture scenario, the symmetry breaking is suppressed by the inadequacy of the stretching stress to make fracture, while in the depolymerization scenario the suppression is ascribed to the smallness of the tension-dependent degradation.

Finally, we would like to discuss about the plastic character of the actin gel. The actin gel under tension may show the plasticity in a particular sense: It is largely believed that Arp2/3, the cross-linker of the actin network, is incorporated to the network only on the surface where the enzymes (fragments of WASP or ActA) for this reaction can be activated. In the bulk of the gel the loss of the cross-linking, therefore, takes place in an irreversible manner with no recovery process of cross-linking. Thus, this process of plasticity in actin gel is mostly equivalent to the hypothesis of depolymerization of our model, and it should therefore be distinguished from the viscoelasticity of Maxwell or Voigt models in which the elastic aspect is not lost irreversibly. Though we have not looked at the plasticity aspect of actin gel entirely in detail, since the plasticity is not an absolutely necessary approach or viewpoint for the purpose of the symmetry breaking. Still, we think that the plasticity could be an interesting subject to be studied more in future. To the authors’ knowledge, there have been no studies about the plasticity of actin gel up to the present time.

We thank M.-F. Carrier for the gift of the medium of motility. We also thank C. Sykes for fruitful discussions and for critical reading of the manuscript. We have profited very much from the insightful questions of the referees, which we incorporated in the discussion section upon revision.

Appendix A. Heuristic derivation of the equations of mechanical balance

Equations (3) and (4) in Section 2 are the equation of mechanical balance of stress components in the spherically and circularly symmetric geometries, expressed in respective relevant coordinate systems. Instead of deriving these from the familiar form in the Cartesian coordinates (symbolically written as $\nabla \cdot \sigma = 0$) through coordinate transformations, we will present an elementary physical interpretation of the equations of mechanical balance. It might help to understand how the lateral tensile stress and the normal compressive stress are related. See, Figure 5. Consider, within a layer of actin gel occupying the radii r_0 and $r_0 + h$, a slice of gel between the radii r and $r + \Delta r$ spanning a solid angle $\Delta\Omega$ (3D) or an angle θ (2D). The lateral tension $\sigma_{\perp\perp}$ gives an effective surface tension $\Delta\Gamma = \sigma_{\perp\perp}\Delta r$ to this slice. Because of the curvature radius, r , of this slice, a sort of the Laplace pressure, $2\Delta\Gamma/r$ (3D) or $\Delta\Gamma/r$ (2D) is generated towards the center ($r = 0$) of curvature. This pressure integrated over the surface, $r^2\Delta\Omega$ (3D) or $r\Delta\theta$ (2D), gives the total force

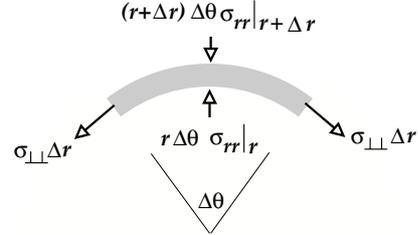


Fig. 5. Forces acting on a curved slice of gel of thickness Δr and length $r\Delta\theta$. The slice is under lateral tension because of forces $\sigma_{\perp\perp}\Delta r$. It is radially compressed because of the forces $(r + \Delta r)\Delta\theta\sigma_{rr}|_{r+\Delta r}$ and $r\Delta\theta\sigma_{rr}|_r$.

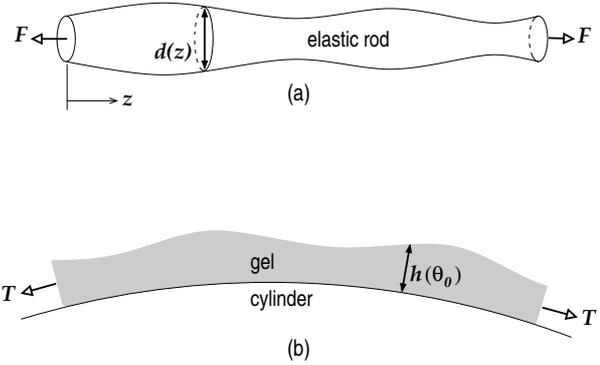


Fig. 6. Stress distribution in elastic structures of varying thickness: (a) Elastic rod of thickness $d(z)$ under tension due to forces F acting at the ends. The tension at coordinate z : $\sigma_{zz} \simeq F/A(d)$, where $A(d) = \frac{\pi}{4}d(z)^2$. (b) Analogous situation in a gel layer of thickness $h(\theta_0)$ under integrated tension T . The tensile stress can be approximated as $\sigma_{\perp\perp} \simeq \frac{T}{h(\theta)}$.

exerted by this thin layer. These force in the respective dimensionality are shown on the right-hand side of the equations below. Now, these forces must be the origin of the difference between the integrated normal stress acting at r and that at $r + \Delta r$. The differences in the respective dimensionality are shown on the left-hand side of the equations below:

$$(r + \Delta r)^2 \Delta\Omega \sigma_{rr}|_{r+\Delta r} - r^2 \Delta\Omega \sigma_{rr}|_r = r^2 \Delta\Omega \frac{2\sigma_{\perp\perp}\Delta r}{r}, \quad (3D)$$

$$(r + \Delta r)\Delta\theta \sigma_{rr}|_{r+\Delta r} - r\Delta\theta \sigma_{rr}|_r = r\Delta\theta \frac{\sigma_{\perp\perp}\Delta r}{r}, \quad (2D)$$

Dividing both hand sides of the above equations by Δr , and letting $\Delta r \rightarrow 0$, we arrive at equations (3) and (4). Note that $\sigma_{rr} < 0$ for compressive stresses.

Appendix B. Elementary physical mechanism of the stress concentration

We describe the basic mechanism of the stress concentration by an illustrating example with a very simple geometry (see, Fig. 6(a)).

Suppose that there is a long elastic rod whose diameter $d(z)$ is inhomogeneous along its long axis, z . We now apply a tensile force to this rod by pulling its ends apart. Once the balance of force is re-established within the rod, the total tensile force integrated over a sectional plane perpendicular to the z -axis is constant along the z -coordinate. Thus, the tensile stress σ_{zz} averaged over this section is inversely proportional to its area, $\pi(d(z)/2)^2$. By such geometrical effect, the tensile stress is concentrated at the thinnest part of the rod.

We could mention an analogous situation in an electric wire transporting a steady electric current. If the thickness of the wire is inhomogeneous, the electronic-current *density* is high in the region where the wire is thin, by the same geometrical effect. The electric-current density plays the role of the tensile stress σ_{zz} in the former case. In fact, the stress is the current density of the momentum [12].

We may compare these quasi-one-dimensional examples with the geometry studied in Section 3 (see Fig. 6(b)). In the latter situation, the gel is under lateral tensile force T . By the same reasoning as above, the lateral tensile stress is large where the thickness is small. Although the shear force between the gel and the cylinder would weaken this effect, the basic mechanism still works.

The geometrical effect discussed here is quite universal: We only need a current density of some physical quantity (*e.g.*, the momentum, the charge, etc.) which is confined along some direction(s).

Appendix C.

We demonstrate that the perturbations of the surface profile have a limited influence on the stress, practically confined within a “skin depth” near the outer surface of the gel layer, where the skin depth is of the order of the wavelength of the perturbation (see Fig. 3 in the text).

- i) To the spherically symmetric gel layer, we introduce a xyz -coordinate system so that its xy -coordinate plane is tangent to the outer surface of the gel layer at its origin, $x = y = z = 0$. We define the sign of z -coordinate so that the bulk of the gel is on the side of $z \leq 0$. We will consider a small neighborhood of the origin so that the curvature of the gel surface is negligible. This apparently flat gel layer is under lateral tension along the xy -plane.
- ii) We introduce a slight sinusoidal perturbation of the surface profile of the gel layer, without allowing the displacement of the gel material. The perturbed surface profile is written as $z = \epsilon_Q \text{Re}[e^{iQx+\phi}]$, with the amplitude ϵ_Q , the wave number Q and the phase ϕ being constant.
- iii) We then let the gel relax until the mechanical balance is re-established within the layer. By this process the stress components $\sigma_{\alpha\beta}$ with $\alpha = x, y, \text{ or } z$ are also perturbed. We denote by $\delta\sigma_{\alpha\beta}$ the perturbed part of the stress components. These $\delta\sigma_{\alpha\beta}$ obey the following

equations:

$$\frac{\partial}{\partial x}\delta\sigma_{x\alpha} + \frac{\partial}{\partial y}\delta\sigma_{y\alpha} + \frac{\partial}{\partial z}\delta\sigma_{z\alpha} = 0,$$

with $\alpha = x, y, \text{ or } z$. We assume that the usual linear elasticity relationship applies to the system. Then the perturbed stress components is related with the displacements (u_x, u_y, u_z) from the unperturbed state through the equation

$$\delta\sigma_{\alpha\beta} = 2\mu \left(u_{\alpha\beta} - \frac{1}{3} \sum_{\gamma} u_{\gamma\gamma} \delta_{\alpha\beta} \right) + K \sum_{\gamma} u_{\gamma\gamma} \delta_{\alpha\beta}$$

with

$$u_{\alpha\beta} \equiv \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_{\alpha}}{\partial x_{\beta}} + \frac{\partial u_{\beta}}{\partial x_{\alpha}} \right),$$

where μ and K are the shear and bulk moduli, the suffices α, β and γ take x, y or z , and $\{x_x, x_y, x_z\} \equiv \{x, y, z\}$. The summation index γ runs over x, y and z , and $\delta_{\alpha\beta}$ is the Kronecker's delta.

- iv) The question is how the quantities $\delta\sigma_{\alpha\beta}$ depend on z for $z < 0$. In the lowest order of ϵ_Q , $\delta\sigma_{\alpha\beta}$, and therefore the displacements u_{α} should depend on x sinusoidally with the wave number, Q . Therefore, the above equations can be reduced to the following matrix equation:

$$\begin{pmatrix} 2\mu \frac{\partial^2}{\partial z^2} - (K + \frac{10}{3}\mu)Q^2 & iQ \frac{\partial}{\partial z} \\ (K + \frac{4}{3}\mu)iQ \frac{\partial}{\partial z} & (K + \frac{10}{3}\mu) \frac{\partial^2}{\partial z^2} - 2\mu Q^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} u_x \\ u_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}.$$

This equation can be finally reduced to the following equation:

$$(\partial_z^2 - Q^2)^2 \psi = 0$$

where ψ is a combination of u_x and u_z . From this equation, we find that the displacements should depend exponentially on z . Among mathematically possible forms $e^{\pm Qz}$, we discard the form e^{-Qz} since this factor grows exponentially towards the negative z -axis. We are then left with the form e^{Qz} for $z < 0$. This indicates that the influence of the perturbations to the surface profile with the wavelength $\sim Q^{-1}$ is practically limited within a region with a “skin depth” $\sim Q^{-1}$ from the outer surface of the gel layer.

Appendix D. The derivation of equations (11) and (12)

Here we show how the stress distribution within the gel layer is calculated for the model described by a)-c) in Section 3. In the polar coordinate, the equations of mechanical balance in the gel layer are written as follows:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial r}(r\sigma_{rr}) + \frac{\partial}{\partial \theta}\sigma_{r\theta} - \sigma_{\theta\theta} &= 0, \\ \frac{\partial}{\partial r}(r\sigma_{r\theta}) + \frac{\partial}{\partial \theta}\sigma_{\theta\theta} + \sigma_{r\theta} &= 0. \end{aligned} \quad (\text{D.1})$$

We integrate the left-hand side of these equations with respect to r from r_0 to $r_0 + h$, noting the boundary conditions, equations (10) and (8). The result reads

$$T - \frac{\partial}{\partial \theta} \bar{T} = -r_0 \sigma_{rr}|_{r_0}$$

and

$$\bar{T} + \frac{\partial}{\partial \theta} T = 0,$$

where we have introduced the total tension, $T \equiv \int_{r_0}^{r_0+h} \sigma_{\theta\theta} dr$, and its analogue for the shear stress, $\bar{T} \equiv \int_{r_0}^{r_0+h} \sigma_{r\theta} dr$. Based on our estimates of the shear stress, $\sigma_{r\theta} \sim \tilde{\mu} \epsilon_q (h^*/r_0)^2$, and the perturbed part of the tensile stress, $\delta \sigma_{\theta\theta} \sim \epsilon_q B h^*/r_0$ (see Sect. 3), we can evaluate the terms on the left-hand side of the above equations. Since $\frac{\partial}{\partial \theta} \sim 1$ under our limitation of the wave number q , we have, $\delta T \sim \frac{\partial}{\partial \theta} T \sim B \epsilon_q h^{*2}/r_0$ and $\bar{T} \sim \frac{\partial}{\partial \theta} \bar{T} \sim \tilde{\mu} \epsilon_q h^{*3}/r_0^2$, where δT is the perturbed part of the total tension T . Assuming $\tilde{\mu} \sim B$, we find that \bar{T} and $\frac{\partial}{\partial \theta} \bar{T}$ are smaller than T and $\frac{\partial}{\partial \theta} T$ by a factor of h^*/r_0 . We, therefore, ignore the terms with \bar{T} , and have the following equations:

$$\frac{\partial}{\partial \theta} T = 0, \quad T = -r_0 \sigma_{rr}|_{r_0}. \quad (\text{D.2})$$

The first equation requires the lateral balance of the integrated tension T , while the second equation requires the homogeneity of the normal compressive stress on the substrate surface, $\sigma_{rr}|_{r_0}$.

From (D.2) we can calculate $\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h^*}$ and $-\sigma_{rr}|_{r_0}$. We employ the ‘‘stacked rubber band model’’ [5,11,12] for the lateral tensile stress $\sigma_{\theta\theta}$, as we did for the symmetric case (see Eq. (1) in the text). Here, we take into account the possible lateral displacement of the gel layer upon the re-establishment of the mechanical balance. We introduce an unknown function $\theta(\theta_0)$ such that the material of gel layer originally at θ_0 is moved to $\theta(\theta_0)$ upon the re-establishment of the mechanical balance (see Fig. 7). The elongation ratio, $(r - r_0)/r_0$ in equation (1) is, therefore, replaced by the form which depends on the parameter θ_0 : $(rd\theta(\theta_0) - r_0 d\theta_0)/r_0 d\theta_0$. Thus, the lateral tension is written as

$$\sigma_{\theta\theta} = B \left(\frac{r}{r_0} \frac{d\theta(\theta_0)}{d\theta_0} - 1 \right), \quad (\text{D.3})$$

where, the shear deformation within the layer has been consistently ignored. (The justification of this approximation concerning another source of error will be discussed in the discussion section, see App. E.) With the definition of T given above, we obtain

$$T = B \left[\left(h(\theta_0) + \frac{h(\theta_0)^2}{2r_0} \right) \frac{d\theta(\theta_0)}{d\theta_0} - h(\theta_0) \right]. \quad (\text{D.4})$$

The function $\theta(\theta_0)$ can be related to $h(\theta_0)$ through the first equation in (D.2), which requires that T is constant.

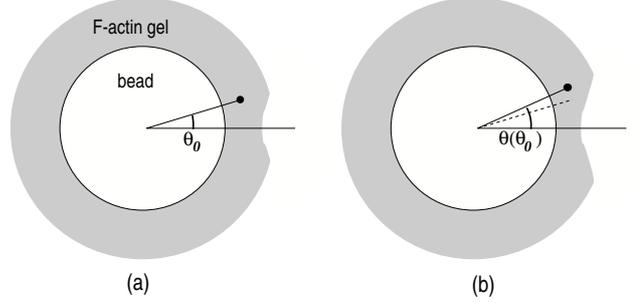


Fig. 7. (a) θ_0 is defined as the angle with respect to a reference line, when a material point (for example, the black dot) is located before the gel is deformed. (b) As a result of elastic deformation, the material point characterized by θ_0 is displaced to a new position at θ . The function $\theta(\theta_0)$ characterizes the elastic deformation.

To fix the value of the constant, T , we recall an apparent condition $\int_0^{2\pi} \frac{d\theta(\theta_0)}{d\theta_0} d\theta_0 = 2\pi$. The result of T is

$$T = B \left[\int_0^{2\pi} \frac{d\theta_0}{h(\theta_0) + \frac{h(\theta_0)^2}{2r_0}} \right]^{-1} \times \left[2\pi - \int_0^{2\pi} \frac{h(\theta_0)}{h(\theta_0) + \frac{h(\theta_0)^2}{2r_0}} d\theta_0 \right]. \quad (\text{D.5})$$

$\frac{d\theta(\theta_0)}{d\theta_0}$ can thus be finally determined in terms of $h(\theta_0)$ (which we do not show explicitly). From the second equation of (D.2) and from equation (D.3), we have

$$\sigma_{\theta\theta}|_{r_0+h(\theta_0)} = \left[h(\theta_0) + \frac{h(\theta_0)^2}{2r_0} \right]^{-1} \times \left[T \left(1 + \frac{h(\theta_0)}{r_0} \right) + B \frac{h(\theta_0)^2}{2r_0} \right], \quad (\text{D.6})$$

$$-\sigma_{rr}|_{r_0} = \frac{T}{r_0}. \quad (\text{D.7})$$

To reach the expressions equations (11) and (12) in the text, we may simply substitute the form $h(\theta_0) = h^* [1 + \epsilon_q \cos(q\theta_0)]$, into equations (D.5-D.6), and develop them with respect to ϵ_q up to the linear order.

Appendix E.

Below we mention briefly aspects which could be improved in our present analysis.

- 1) *Extend the analysis to modes with $q \neq \frac{2\pi r_0}{h^*}$.*
Although the instability against the disturbances of modes $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$ is sufficient to destroy the system's stability, our analysis can say nothing about what is the fastest, or the most unstable, mode of the disturbance. The fact that the characteristic time of the symmetry breaking in our analysis gives reasonable values suggests that the other modes of perturbations might

grow, if they do, at a rate not highly exceeding the one we have analyzed. In fact, some efforts to refine the present analysis (see below) indicate that, for $q < \frac{2\pi r_0}{h^*}$, the instability is weakened or even suppressed, while for the modes, $q > \frac{2\pi r_0}{h^*}$, there is no sign of appreciable q -dependences. However, the modulation of the micro-scale comparable to the mesh size of the gel is not accessible by the continuum approach. (Note that the quasi-one-dimensional analysis of [10] claims the instability of the mode $q = 2$.)

2) *Remove the full slip boundary condition.*

As discussed in Section 3 we have justified this boundary condition when we analyzed the evolution of the modes $q \simeq \frac{2\pi r_0}{h^*}$, since, there, the choice of the boundary condition on the substrate surface is expected to be insensitive to the stability result. For the other modes, especially for $q < \frac{2\pi r_0}{h^*}$, we should take into account the friction on this surface due to the temporal linkage between the actin filament with the substrate [11]. (About the discussion of the relation between the friction and the temporal linkage, see [19, 15].) As a modification of the present model, we have incorporated the finite friction force on the substrate surface, which is proportional to the slipping velocity of the gel along the surface. Though details will not be shown [13], the result indicates that, while all the modes remain unstable, the instability is weakened for long wavelengths, *i.e.* for small values of q .

3) *Extend the analysis to the non-linear regime.*

Our analysis does not infer how the comet of actin gel is formed and continues to grow after the symmetric shape of the layer around the bead is lost. This is a non-linear problem. Van Oudenaarden and Theriot have demonstrated in their numerical modeling that the comet formation shows its optimal performances for a certain parameter value related to the depolymerization at the substrate surface. The comparative study from our point of view is yet to be done. (As for the steady growth of the comet from *Listeria*, see [11]).

4) *Extend the analysis to soft beads.*

Endosomes, lysosomes, vesicles and fluid drops deform as the comet develops, revealing the importance of mechanical stresses [2, 20, 21]. The deformation of a fluid drop has been fully analyzed within the framework of the elastic analysis and shown to be quantitatively in agreement with the experiment [22]. The symmetry-breaking onset remains to be worked out. As proposed in the discussion, the early stages would discriminate between the different mechanisms.

5) *Removal of the assumption of the isotropic gel.*

Generally speaking, the microstructure of the gel polymerized from a surface must distinguish the radial direction from the lateral ones. Especially, the actin gel branched by the help of the protein Arp2/3 is shown to have a topology like a “forest” rather than like a network [23]. It will be the entanglement among the branches of the “trees” of semi-flexible filaments that supports the tensile stress within the gel. Though we expect no qualitative change of our result upon

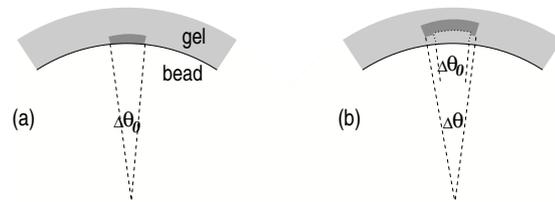


Fig. 8. Generation of a mechanical frustration (internal stress) caused by simultaneous polymerization and lateral deformation; a rectangular piece of gel (marked block) is displaced and deformed while keeping the connectivity with its neighboring piece (block shown by dotted lines).

the incorporation of the elastic anisotropy of the gel, there should be quantitative differences. For the further analysis, we also need the experimental data on the anisotropic elastic constants [12].

6) *Extend the analysis where the gel density is spatially heterogeneous.*

The effect of the spatial heterogeneity of the catalytic activity of the enzyme may have several aspects. The one which has been discussed in Section 5.2 is the modulation of the polymerization rate, \bar{k}_p . The other aspect which is related to the spatial heterogeneity of elastic moduli of gel may also deserve consideration. In fact, the heterogeneity of the elastic moduli will be closely related to the heterogeneity of the factors k_d and c_d both concerning the depolymerization processes kinematically and energetically, respectively. It is therefore impossible to predict where does the thinning of the gel layer proceed most rapidly. However, the rule of thumbs is again that the positive feedback mechanism mentioned above: once the degradation is advanced in a portion of gel layer than elsewhere, the stress concentration is most likely to occur and the degradation will be further accelerated there. Viscoelastic (*e.g.*, of Maxwell or Voigt types) or frictional effects in the bulk gel or on the substrate surface, respectively, may limit this positive feedback loop. A detailed discussion will be the task of future works.

7) *Take account of the frustration of stress in gel.*

In the analysis of Section 4, the total tension $T \equiv \int_{r_0}^{r_0+h} \sigma_{\theta\theta} dr$ has been calculated by substituting the expression of the stacked rubber band model, equation (D.3). This operation ignores the fact that the gel material at two different radii are created at different points of time. Figure 8 illustrates how the simultaneous polymerization and lateral deformation create a mechanical frustration within the gel material: (a) Consider a thin slice of actin gel created at the substrate surface during a short time interval, say, between t_1 and $t_1 + dt$ (the dark gray region occupying the angle $\Delta\theta_0$). We may expect that this part of gel which is just grown bears no lateral stress, to a good approximation. In the context concerning this slice just above the substrate surface, we would then set $d\theta(\theta_0)/d\theta_0 = 1$ in equation (D.3). (b) After the consecutive time interval, $t_1 + dt < t < t_1 + 2dt$,

the same spatial region, which is now indicated by the dotted lines, is occupied by a newly grown gel under no lateral tension. Thus again $d\theta(\theta_0)/d\theta_0 = 1$ for this region. However, as for the previously grown material which we have marked in dark gray in Figure 8(a), it now occupies the region just outside the original one (shown again in dark gray), and occupies the angle $\Delta\theta$. Generally, $\Delta\theta$ is different from $\Delta\theta_0$ as far as there is a global lateral displacement of gel during the time interval $t_1 + dt < t < t_1 + 2dt$. Thus, in the context concerning this region in dark gray, we would set $d\theta(\theta_0)/d\theta_0 \neq 1$ in equation (D.3). This contradiction indicates a natural process through which a mechanical frustration is created within the gel layer, and shows that equation (D.3) is only approximative.

Taking account of this fact in the model requires a lot of complication of the formalism, but the linear analysis is still feasible. Though the details will not be shown [13], the result indicates that, while the modes with small q values now become stable, the instability persists for $q > q_c$ with a finite positive threshold q_c . Our simple analysis with equation (D.3) is still a good approximation if the characteristic time of the instability τ is short enough as compared with the turnover time of the gel, r_0/v_{gel} . From equation (22) this criterion reads $(2 + \chi)/(c_d B \chi) \ll 1$. Substituting the same values for $c_d = \xi^3/T$, B , and χ as in Section 5.1, the left-hand side of the above criterion becomes 0.16 if we take $\xi = 30$ nm for the mesh size of the actin gel. We, therefore, suppose that our approximation is pretty good for the above parameter range.

References

1. F. Gerbal, V. Laurent, A. Ott, P. Chaikin, J. Prost, *Eur. Biophys. J.* **29**, 134 (2000).
2. J. Taunton, B.A. Rowning, M.L. Coughlin, M. Wu, R.T. Moon, T.J. Mitchison, C.A. Larabell, *J. Cell Biol.* **148**, 519 (2000).
3. T.P. Loisel, R. Boujemaa, D. Pantaloni, M.F. Carlier, *Nature* **401**, 613 (1999).
4. L.A. Cameron, M.J. Footer, A. van Oudenaarden, J.A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4908 (1999).
5. V. Noireaux, R.M. Golsteyn, E. Friedrich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, C. Sykes, *Biophys. J.* **78**, 1643 (2000).
6. D. Yazar, W. To, A. Abo, M.D. Welch, *Curr. Biol.* **9**, 555 (1999).
7. A. Bernheim-Grosswasser, S. Wiesner, R.M. Goldsteyn, M.-F. Carlier, C. Sykes, *Nature* **417**, 308 (2002).
8. S. Rafelski, P. Lauer, D. Portnoy, J. Theriot, <http://cmgm.stanford.edu/theriot/movies.htm>: *Skidding motility of mutant Listeria* (2002).
9. A. van Oudenaarden, Julie A. Theriot, *Nature Cell Biol.* **1**, 493 (1999).
10. A. Mogilner, G. Oster, *Biophys. J.* **84**, 1591 (2003).
11. F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin, J. Prost, *Biophys. J.* **79**, 2259 (2000).
12. L. Landau, E. Lifchitz, *The Theory of Elasticity* (Mir, Moscow, 1967).
13. K. Sekimoto, F. Jülicher, J. Prost, unpublished (2001).
14. K. Kassner, C. Misbah, J. Muller, J. Kappey, P. Kohlert, *Phys. Rev. E* **63**, 036117 (2001). (The original literatures on the crystal growth related to the stress concentration, such as R.J. Asaro, W.A. Tiller, *Metall. Trans.* **3**, 1789 (1972) and M.A. Grinfeld, *Dokl. Akad. Nauk USSR* **265**, 836 (1982) are cited and described therein.)
15. F. Gerbal, V. Noireaux, C. Sykes, F. Jülicher, P. Chaikin, A. Ott, J. Prost, R.M. Golsteyn, E. Friederich, D. Louvard, V. Laurent, M.F. Carlier, *Pramana* **53**, 155 (1999).
16. J. Prost, in *Physics of Bio-molecules and Cells, Les Houches Session LXXV, 2-27 July 2001*, edited by H. Flyvbjerg *et al.*, Les Houches Summer School Series, Vol. **75** (Springer, 2002).
17. M. Dogterom, B. Yurke, *Science* **278**, 856 (1997).
18. J. Plastino, I. Lelidis, J. Prost, C. Sykes, *Eur. Biophys. J.* (published on line, 09 December, 2003); DOI: 10.1007/s00249-003-0370-3.
19. K. Tawada, K. Sekimoto, *J. Theor. Biol.* **150**, 193 (1991).
20. P.A. Giardini, D.A. Fletcher, J.A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6493 (2003).
21. A. Upadhyaya, J.R. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani, A. van Oudenaarden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4521 (2003).
22. O. Campas, J.-F. Joanny, J. Prost, unpublished.
23. L.A. Cameron, T.M. Svitkina, D. Vignjevic, J.A. Theriot, G.G. Borisy, *Curr. Biol.* **11**, 130 (2001).

Chapitre III

Mouvement par l'actine d'un objet déformable

Pour les systèmes se déplaçant par polymérisation de l'actine, nous avons vu que l'analyse mésoscopique du gel d'actine permet d'expliquer les comportements observés expérimentalement. Cependant, l'effet de pression exercé sur la partie arrière de la bille en mouvement (ou de *Listeria*) n'a jamais été mis directement en évidence.

Afin de visualiser directement les contraintes que sont capables de générer les gels d'actine, et pour en mesurer l'amplitude, nous avons mis au point un nouveau type de système biomimétique. Nous avons substitué la bille de latex rigide par une goutte d'huile. La mesure des déformations de la goutte d'huile par le gel d'actine nous permet de remonter aux contraintes produites par le gel.

Au cours de ce chapitre, nous commencerons par présenter le système expérimental et les grandeurs physiques qui le caractérise. Nous verrons ensuite en détail le modèle théorique qui a été élaboré pour interpréter nos observations. Nous finirons enfin par décrire l'influence de l'ajout de protéines réticulant les filaments d'actine sur les déformations de la goutte.

Sommaire

III.1	Présentation du sujet et position du problème	103
III.2	Expériences	106
III.2.1	Préparation des gouttes d'huile	106
III.2.2	Influence des extraits cellulaires	106
III.2.3	La protéine nucléatrice	107
III.3	Mesure de la tension interfaciale	111
III.3.1	Position du problème	111
III.3.2	Méthodes et mesures	112
III.3.3	Conclusion	122
III.4	Déformation de vésicules lipidiques	124
III.4.1	Forces de compressions générées par une comète d'actine sur une vésicule lipidique [Giardini, 2003]	124
III.4.2	Mise en évidence des forces induites par polymérisation de l'actine sur une vésicule lipidique [Upadhyaya, 2003]	126
III.5	Observations expérimentales et modélisation	129
III.5.1	Etat stationnaire	129
III.5.2	Taille et déformation	130
III.6	Analyse élastique de la déformation	132
III.6.1	Présentation du modèle	132
III.6.2	Influence de l'ajout de protéines réticulant l'actine sur la déformation	139
III.7	Conclusion	142

III.1 Présentation du sujet et position du problème

Comme on l'a vu précédemment, la polymérisation de l'actine génère des forces capables de déformer des membranes, et ce mécanisme joue un rôle fondamental dans la motilité cellulaire (cf. Chapitre I). Des endosomes et des lysosomes se déplacent à l'intérieur de la cellule en formant également une comète d'actine. Les auteurs de l'article [Tauton, 2000] ont montré que la protéine N-WASP était présente à leur surface. On peut noter sur leurs images de microscopie électronique que la comète formée est très semblable à celle de la *Listeria* lorsqu'elle se déplace, mais surtout que les vésicules sont déformées sous l'action de l'actine [Merrifield, 1999 ; Tauton, 2000] (figure III.1) . Ces observations sont une confirmation de l'importance du caractère élastique du gel pour expliquer la génération des forces à l'origine du mouvement. C'est également un argument en faveur du modèle décrivant le mouvement de la *Listeria* qui prévoit que le gel d'actine formé sur le pathogène induit des forces compressives à l'arrière de la bactérie [Gerbal, 2000] (cf. I.3.4.3).

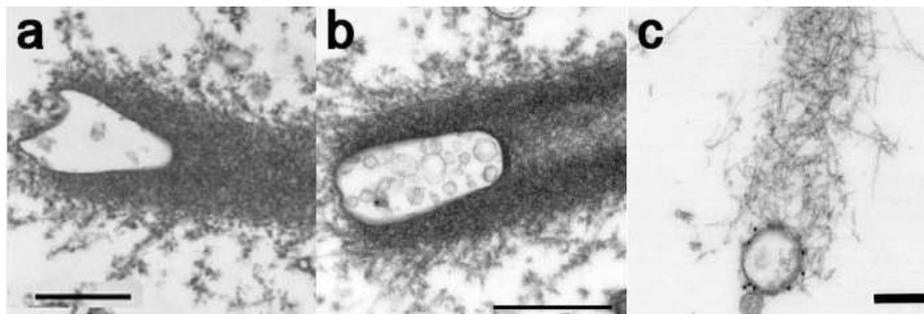


FIG. III.1: Vésicules se déplaçant en formant une comète d'actine comme *Listeria*. Vue par microscopie électronique. On peut voir différentes formes prises par les vésicules sous l'action de l'actine. Sur la figure c, la présence de la protéine N-WASP qui active la polymérisation de l'actine est mise en évidence à l'aide de particules d'or recouvertes d'anticorps anti-N-WASP. *a et b* barre 500nm , *c* 200nm [Tauton, 2000].

L'importance de ces mécanismes fondamentaux en biologie a conduit à l'élaboration du système artificiel des billes de latex présenté en première partie, car il permet de procéder à une étude plus systématique des mécanismes biochimiques et biophysiques mis en jeu. Mais la rigidité des billes ne permet pas une visualisation directe des contraintes qu'exerce le gel d'actine sur la surface de la bille. Les images en microscopie électronique que l'on voit ci-dessus montrent toute une « zoologie » d'endosomes différemment déformés. Par exemple sur la figure III.1a la vésicule est très pincée avec une comète pleine alors que sur la figure III.1b la vésicule est allongée et présente une comète creuse. La fragilité des échantillons lors

de la préparation pour la microscopie électronique ne nous permet pas de tirer de conclusion définitive quant à l'action des comètes d'actine sur les vésicules. Afin d'obtenir des systèmes contrôlés, nous avons remplacé les billes de latex, dans les systèmes biomimétiques, par des billes d'huile déformables. A la surface de ces gouttes, on a adsorbé la protéine VCA pour activer la polymérisation de l'actine. L'objectif est d'avoir accès à ces forces de compression si elles existent. D'autres équipes concurrentes ont dans le même temps conçu d'autres systèmes artificiels pour une observation directe des déformations engendrées par polymérisation de l'actine, ils ont opté pour la fabrication de vésicules phospholipidiques fonctionnalisées en y incorporant la protéine ActA de *Listeria* [Upadhyaya, 2003 ; Giardini, 2003] (cf III.4).

Nos premiers résultats ont été de recréer le mouvement à partir d'une goutte d'huile micrométrique recouverte des mêmes protéines que celles utilisées sur le système des billes dures. L'actine polymérise à la surface de la goutte et finit par former une comète qui va propulser la goutte de manière similaire à ce qui est observé pour *Listeria* (figure III.2). Ce système a été initié par Vincent Noireaux au laboratoire. Le détail de l'expérience est exposé dans la suite du manuscrit, mais déjà, on peut voir figure III.2 que ces gouttelettes sont déformées en poire sous l'action de la comète d'actine.

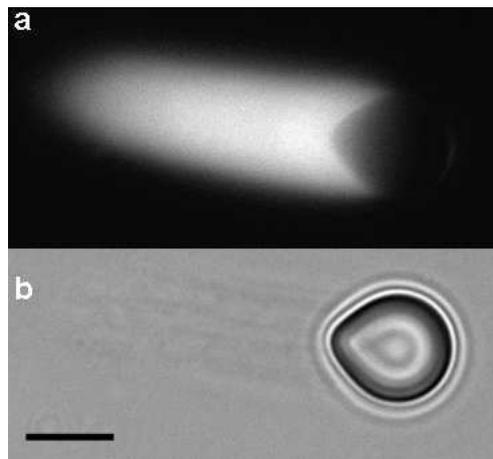


FIG. III.2: Goutte d'huile déformée et mise en mouvement par le gel d'actine qui polymérise à sa surface : a) observation de la comète d'actine par fluorescence (l'actine est marquée à la Rhodamine), b) Déformation observée en lumière blanche, on distingue la présence de la comète à l'arrière de la goutte. Barre $5\mu\text{m}$

La déformation que l'on observe est la signature des contraintes qu'exerce le gel d'actine sur la goutte. Lorsque l'actine exerce une pression sur la goutte, la seule résistance qui limite la déformation provient de la tension interfaciale qui existe entre la goutte d'huile d'une part et les extraits cellulaires qui l'entourent d'autre part. Cela réduit grandement les paramètres

physiques à déterminer pour caractériser le système. La simplicité et l'absence d'intervention extérieure lors de l'expérience sur ce système diminuent les sources d'*artefact* possibles et font de cette goutte d'huile un modèle intéressant pour l'étude des contraintes qu'un gel d'actine peut produire.

III.2 Expériences

L'expérience se déroule en deux étapes, la préparation des gouttes d'huiles recouvertes de protéines recrutant l'actine et l'observation des déformations de la goutte sous l'effet de la polymérisation.

III.2.1 Préparation des gouttes d'huile

On réalise dans un premier temps une émulsion en mélangeant une huile alimentaire ($7\mu\text{L}$ d'Isio4) avec une solution tampon ($293\mu\text{L}$ de borate) que l'on sonique pendant quelques secondes. Les gouttes d'huiles sont ensuite fonctionnalisées. La protéine VCA possède une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Par incubation de l'émulsion dans une solution contenant la protéine VCA, du fait du caractère amphiphile de la protéine, celle-ci vient se mettre à l'interface entre l'huile et la solution aqueuse qui l'entoure. On prend ensuite une petite quantité de ces gouttes ($0,2\mu\text{L}$) que l'on mélange à $20\mu\text{L}$ d'extraits cellulaires Hela S3. Le mélange est mis entre lame et lamelle pour l'observation sous microscope de la croissance du gel d'actine autour des gouttes. Le détail du protocole de purification des protéines est reporté dans en annexe.

III.2.2 Influence des extraits cellulaires

Nous avons constaté au cours de nos expériences (aussi bien lorsqu'on utilise des billes de latex que des gouttes d'huiles), que les résultats obtenus varient beaucoup lorsque l'on utilise des extraits cellulaires qui ne sont pas issus de la même préparation. Bien que nous utilisions toujours des extraits Hela S3 que nous complétons toujours de la même façon, les vitesses mesurées, la densité du gel d'actine, le nombre de comètes formées ainsi que la déformation des gouttes varient sensiblement lorsque on utilise des lots d'extraits différents. Nous n'avons pas été les seuls à remarquer ces fluctuations dans les comportements des systèmes biomimétiques. En effet, une étude récente [Cameron, 2004] s'est intéressée à l'effet, sur la vitesse des billes de latex, de certains paramètres expérimentaux tels que la dilution des extraits cellulaires ou l'adjonction d'actine au milieu. Les auteurs ont observé que la dilution des extraits influe de manière non triviale sur la vitesse des billes. Contrairement à ce qu'on attendrait, ils constatent également, qu'un excès d'actine musculaire réduit la vitesse des billes. Cette étude confirme donc nos observations.

Nous avons pour notre part, préparé plusieurs lots d'extraits cellulaires au cours de nos études sur la déformation des gouttes d'huile. Au cours de nos premières études, nous

fonctionnalisions nos gouttes d'huile en les faisant incuber dans une solution de VCA assez concentrée (0,6 μ M). Il s'est avéré, lorsque nous avons préparé de nouveaux extraits, que dans ces conditions expérimentales il ne se formait que très peu de comètes, ce qui rendait difficile les études sur les déformations induites par la comète d'actine. Nous avons donc cherché à optimiser le système expérimental pour l'observation du maximum de comètes. Comme nous le décrivons dans le paragraphe qui suit, la densité en protéine VCA à la surface des gouttes d'huile est apparue comme un paramètre fondamental qui influe fortement sur le comportement des gouttes. Notons que les résultats qui seront présentés dans la suite du manuscrit correspondent toujours à des expériences faites en utilisant le même lot d'extrait.

III.2.3 La protéine nucléatrice

III.2.3.1 Densité de greffage

Lorsque l'on met les gouttes dans des extraits cellulaires pour observer la polymérisation de l'actine, la proportion de gouttes formant une comète d'actine pour se déplacer varie de quelques pour-cent à environ 80% dans le meilleur des cas. Dans notre étude pour optimiser la proportion de gouttes formant une comètes, afin de faire varier la densité de VCA sur les gouttes, nous avons mis en compétition la VCA avec une autre protéine. La protéine VCA que nous utilisons possède une séquence « étiquette » GST (Glutathion-S-Transferase) qui nous sert notamment à la purification de la protéine. La protéine GST est également purifiable seule. Lorsque l'on met l'émulsion de gouttes d'huile dans une solution contenant à la fois de la VCA-GST et de la GST, une compétition s'exerce entre les deux protéines pour se mettre à la surface de l'huile. Cela nous permet de faire varier la densité de VCA présente *in fine* sur les gouttes. Pour visualiser la distribution de la VCA à la surface, on la marque avec de la FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate) qui est un fluorophore absorbant les radiations dans le bleu (max. 490nm) et restituant une fluorescence dans le vert (max. 520nm). En testant différentes proportions entre VCA et GST dans le milieu d'incubation et en mesurant l'intensité de fluorescence autour des gouttes, nous avons constaté que la densité de VCA sur les gouttes croît linéairement avec la proportion de VCA dans la solution d'incubation (figure III.3). Une alternative à ce procédé était d'utiliser simplement des solutions moins concentrée en VCA, mais lorsqu'on ne fait que diminuer la concentration en VCA, sans mise en compétition avec GST, il est alors beaucoup plus difficile de diminuer la densité finale de VCA sur les gouttes.

Cette méthode, même si elle ne donne pas de mesure quantitative de la densité de VCA

Mélange n°	Concentration en GST (μM)	Concentration en VCA (μM)
1	0	6,7
2	15,4	3,3
3	23,1	1,7
4	26,9	0,8

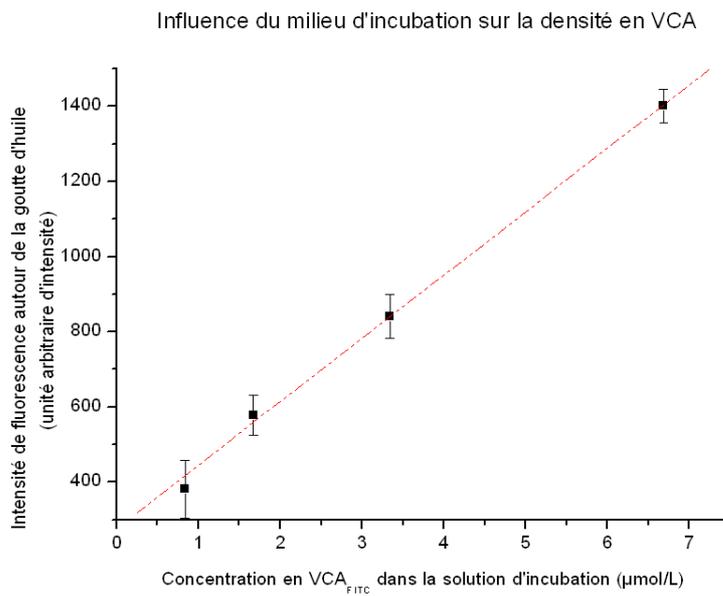


FIG. III.3: Influence de la compétition entre VCA et GST sur la densité finale en VCA sur les gouttes d'huile

sur les gouttes, nous permet d'observer l'évolution de la densité finale en VCA en présence de GST. En testant ensuite les différentes solutions dans des extraits Hela, il est apparu que le cas où la densité en VCA est maximale sur les gouttes n'est pas celui où l'on observe la formation du plus grand nombre de comètes. Le cas le plus favorable fut obtenu pour un mélange d'incubation contenant $1,7 \mu\text{M}$ de VCA et $23 \mu\text{M}$ de GST. C'est cette préparation que nous utiliserons dans toutes nos expériences par la suite.

III.2.3.2 Répartition de la protéine nucléatrice

On s'est demandé dans quelle mesure la répartition de la VCA pouvait changer à la surface de la goutte lors de la formation de la comète. Comme on vient de le faire pour mesurer les variations de densité de VCA, on peut également utiliser la VCA marquée FITC pour observer la répartition de la protéine une fois la comète d'actine formée. Au départ, lorsque l'on met la goutte d'huile recouverte de VCA dans des extraits cellulaires, la protéine est uniformément répartie autour de la goutte et le gel croît de façon isotrope. Lorsque survient la brisure de symétrie dans le gel et que la comète se forme, on observe que la VCA se localise là où la comète est attachée à la goutte (figure III.4).

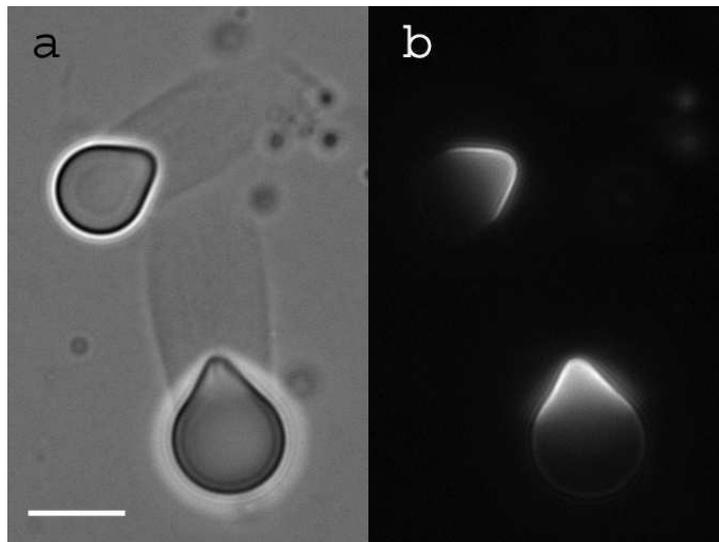


FIG. III.4: Mise en évidence de la polarisation de la protéine nucléatrice VCA lors de la formation de la comète d'actine : a) vue en lumière blanche on voit les comètes d'actine à l'arrière des gouttes ; b) vue en fluorescence, la VCA est marquée à la FITC. On voit que la protéine se trouve dans la même région que la comète.

L'aspect fluide de la surface de la goutte favorise l'apparition d'une brisure de la symétrie du gel qui précède la formation de la comète d'actine. De plus, les filaments d'actine sont

connectés de façon transitoire avec la protéine VCA lors de la polymérisation. Ainsi, très certainement, lors de la brisure de symétrie dans le gel, celui-ci doit entraîner une grande partie de la VCA avec lui. Si on mesure la fluorescence due à la VCA-FITC le long du profil de la goutte, on constate que le signal est six fois plus important du côté de la comète (figure III.5).

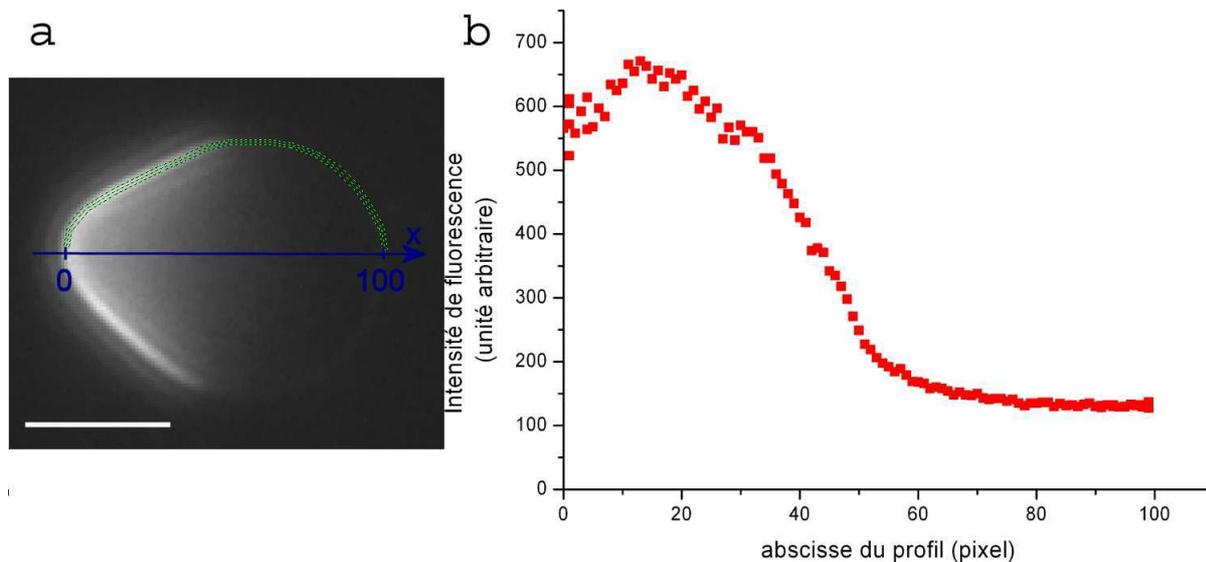


FIG. III.5: a) Goutte où l'on distingue la ligne verte le long de laquelle on a mesuré l'intensité de fluorescence de la VCA marquée FITC (barre 3 μm), b) Mesure de l'intensité de fluorescence de la VCA le long du profil de la goutte.

Dans les expériences utilisant des billes de latex rigides, lorsqu'il y a formation d'une comète, on observe parfois sur un temps long (plusieurs heures) au retour à un état où la bille arrête de se déplacer et l'actine se remet à polymériser en symétrie sphérique. Il en va tout autrement dans le cas des gouttes d'huile, car la capacité de VCA à se déplacer à la surface de l'huile facilite non seulement la survenue de la brisure de symétrie, mais elle participe également à maintenir l'asymétrie issue de la formation de la comète. En effet, une fois VCA localisée à l'arrière de la goutte, c'est uniquement dans cette région que se fera la polymérisation de l'actine, ce qui empêche un retour à une répartition homogène de la protéine autour de la goutte.

III.3 Mesure de la tension interfaciale

Nous nous sommes attachés à mesurer les tensions interfaciales du système afin de pouvoir ensuite caractériser la répartition des contraintes dues à l'actine. Nous présentons dans la suite un bref rappel du cadre des mesures, puis comment nous avons procédé pour obtenir les valeurs des tensions interfaciales. Nous avons caractérisé l'influence de la VCA (et non pas VCA+GST) et des extraits cellulaires sur la tension interfaciale.

III.3.1 Position du problème

La tension interfaciale entre deux liquides est la signature de l'interaction plus ou moins répulsive entre les molécules de part et d'autre de l'interface. Plus les molécules de surface sont dans un état énergétiquement défavorable, plus la tension interfaciale est importante. Dans le cas qui nous intéresse, on se trouve dans la configuration d'une goutte d'huile recouverte d'une protéine qui active la polymérisation de l'actine (VCA) que l'on immerge dans des extraits cellulaires (figure III.6). Il faut donc garder en tête que les extraits de cellule participent très certainement eux aussi à la tension interfaciale.

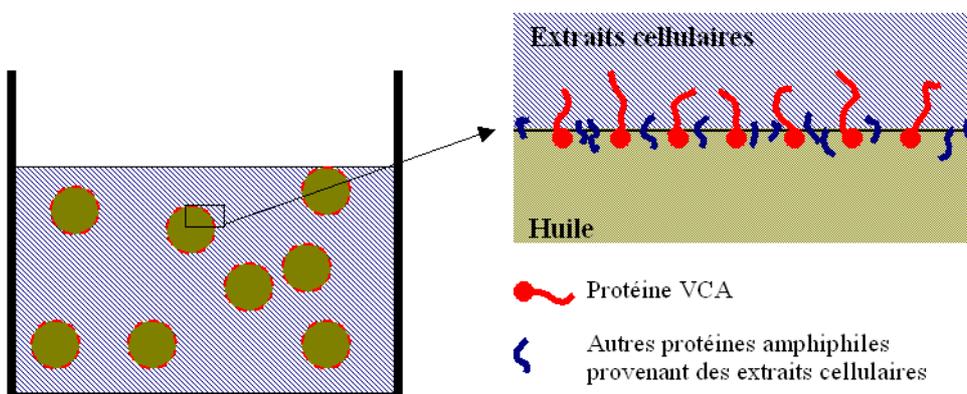


FIG. III.6: Schéma de l'interface entre une goutte d'huile recouverte de VCA et les extraits cellulaires

La présence de molécules amphiphiles à l'interface entre un liquide et un gaz ou entre deux liquides a tendance à diminuer la tension interfaciale entre ces deux phases. Dans notre cas, nous avons deux sources de molécules amphiphiles qui vont se mettre à l'interface entre l'huile et les extraits cellulaires. En effet, il y a d'une part la protéine qui sert d'activateur pour la polymérisation de l'actine, que l'on va adsorber à la surface de la goutte, et la seconde source provient des extraits cellulaires qui contiennent un très grand nombre de protéines

susceptibles de venir se mettre à l'interface et influencer sur la tension interfaciale. L'observation expérimentale d'une répartition inhomogène de VCA (figure III.4) nous amène à une question supplémentaire : comment cette répartition va-t-elle influencer sur la tension interfaciale vu que la VCA colocalise toujours avec la position de la comète ?

On se retrouve donc avec un système possédant potentiellement deux tensions interfaciales différentes suivant que l'on considère la région recouverte d'actine ou celle qui en est dépourvue. Le risque inné à cette situation est d'avoir une influence importante d'un effet Marangoni dans notre système. En effet, si la tension interfaciale au niveau de la partie vierge en VCA est supérieure à celle de la zone recouverte par la protéine, alors une partie de la déformation en cône de la goutte d'huile sera due uniquement à cette différence de tension interfaciale le long de la goutte. Dans le cas inverse, c'est à dire si la tension interfaciale dans la région où il n'y a pas d'actine est inférieure à celle où se trouve la VCA, alors l'effet Marangoni viendrait s'opposer à la déformation, ce qui entraînerait une sous estimation des contraintes exercées par le gel. Même si, la présence dans les extraits cellulaires d'un très grand nombre de protéines amphiphiles (donc susceptibles de venir se mettre à l'interface avec l'huile), permet de pressentir que ces protéines auront une influence prépondérante sur la valeur finale de la tension interfaciale, il était cependant important de vérifier expérimentalement que les valeurs des tensions interfaciales sont très proches dans les deux régions de la goutte. Nous avons donc étudié l'impact sur la tension interfaciale, des deux sources de molécules amphiphiles qui viennent se mettre à l'interface dans notre système.

III.3.2 Méthodes et mesures

Afin d'évaluer l'influence de VCA et des protéines issues des extraits cellulaires, différentes techniques ont été utilisées. Le matériel biologique tel que les extraits cellulaires ou les protéines qui activent la polymérisation de l'actine ne sont pas des produits disponibles en grande quantité et ils nécessitent un travail important de préparation et de purification. Pour cette raison, nous nous sommes orientés vers des techniques de mesure de la tension interfaciale utilisant relativement peu de liquide (de l'ordre de la centaine de microlitres). Deux techniques ont été mises en œuvre, une première utilisant l'équilibre entre pression hydrostatique et tension interfaciale au travers d'une micropipette et la seconde analysant la forme de la goutte pendante au bout d'un capillaire et soumise à la gravitation.

III.3.2.1 Micropipettes

Technique

Cette méthode repose sur la mesure du rayon de courbure qui se crée entre deux liquides au sein d'une micropipette dont l'extrémité est conique [Lee, 2001] (figure III.7).

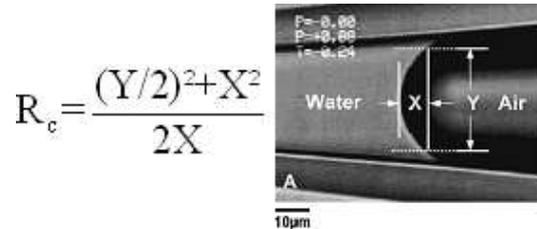


FIG. III.7: Mesure du rayon de courbure Rc à l'interface eau/air dans une micropipette [Lee, 2001]

La technique est basée sur l'équation de Young et Laplace [Laplace, 1805] qui décrit l'équilibre entre la tension interfaciale et la pression exercée au niveau de l'interface courbée qui sépare les deux liquides

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)$$

avec $\left\{ \begin{array}{l} \gamma \text{ est la tension interfaciale} \\ R \text{ et } R' \text{ sont les rayons de courbure de l'interface} \\ \Delta P \text{ est la difference de pression hydrostatique entre les deux liquides} \end{array} \right.$

La micropipette contenant le liquide 1 est reliée d'un coté à un réservoir d'eau qui sert à exercer une pression dans la micropipette et son autre coté (celui qui est ouvert) est immergé dans une chambre contenant le liquide 2. Le liquide contenu dans la chambre entre dans la micropipette par capillarité et progresse le long de la zone conique jusqu'à atteindre un rayon de courbure tel que la tension interfaciale égalise la pression exercée dans la micropipette via la colonne de liquide connecté à la micropipette (figure III.8).

Ici l'interface est une calotte hémisphérique, elle est donc caractérisée par un seul rayon de courbure Rc et l'équation de Laplace devient $\Delta P = 2\gamma/Rc$ (figure III.7). Rc est égal au rayon de la pipette au niveau de l'interface seulement si l'angle de contact entre les liquides et la paroi de la pipette est nul, autrement dit si les liquides mouillent totalement les parois.

La mesure de Rc donne accès à la tension interfaciale γ , mais pour obtenir une mesure précise de γ avec cette méthode, il faut tracer ΔP en fonction de $1/Rc$. A chaque valeur de la pression que l'on applique en changeant le niveau de la colonne d'eau, correspond un

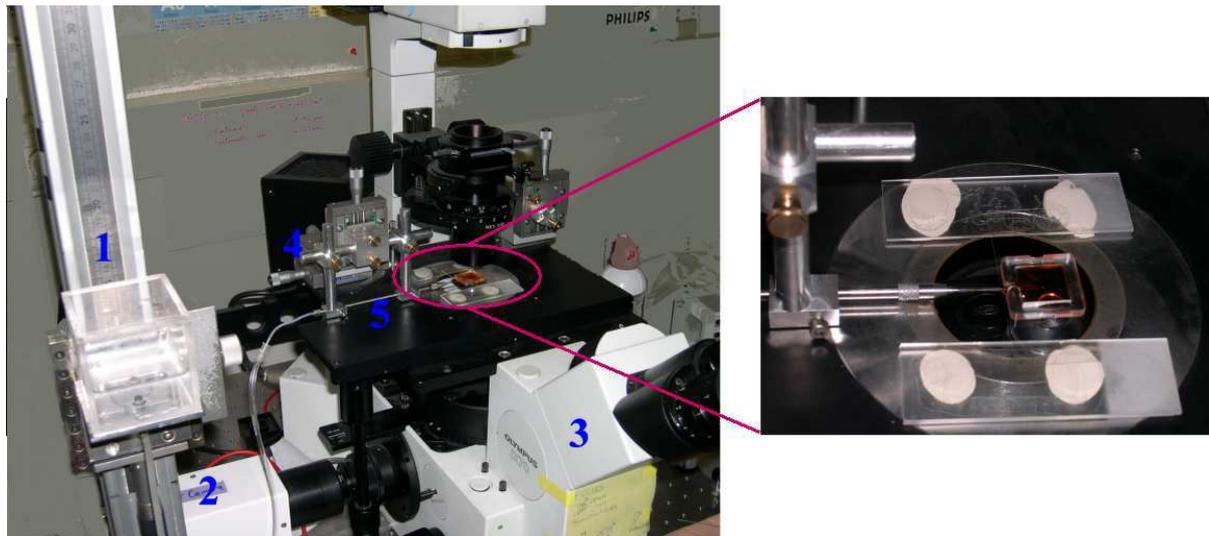


FIG. III.8: Montage expérimental de mesure de tension interfaciale avec une micropipette : 1. la colonne d'eau qui impose une pression dans la micropipette, 2. camera, 3. microscope inversé, 4. micromanipulateurs pour déplacer la micropipette en 3D, 5. porte micropipette et micropipette.

rayon de courbure d'équilibre R_c . La variation de ΔP entraîne la mise en mouvement de l'interface jusqu'à atteindre la position du nouveau R_c d'équilibre (figure III.9).

Mesures

Afin de s'assurer de la validité de la technique, une série de mesures de tensions interfaciales dont les valeurs sont connues dans la littérature a été entreprise (cf. tableau ci-dessous).

On notera tout de même que la mesure est très sensible à la présence de poussières ou autres impuretés mais l'expulsion d'une goutte du liquide contenu dans la pipette permet un renouvellement facile de l'interface. Les mesures effectuées présentent un décalage avec la littérature dû sans doute à une différence de température entre nos mesures et celles de la littérature.

On désire étudier dans un premier temps l'influence de la VCA sur la tension interfaciale lorsqu'elle se met à la surface de l'huile. Pour ce faire, on remplit la micropipette avec de l'huile, on la raccorde au système de pression puis on la trempe dans une solution contenant de la VCA $1,7\mu\text{M}$. On mesure donc R_c pour différentes valeurs de ΔP . Or la VCA met environ 1 heure à s'adsorber sur l'huile, il faut donc laisser le temps à la protéine de se mettre à l'interface avant de mesurer le rayon de courbure (figure III.10).

On voit que la courbe obtenue n'est pas une droite aussi parfaite que lorsqu'on utilise

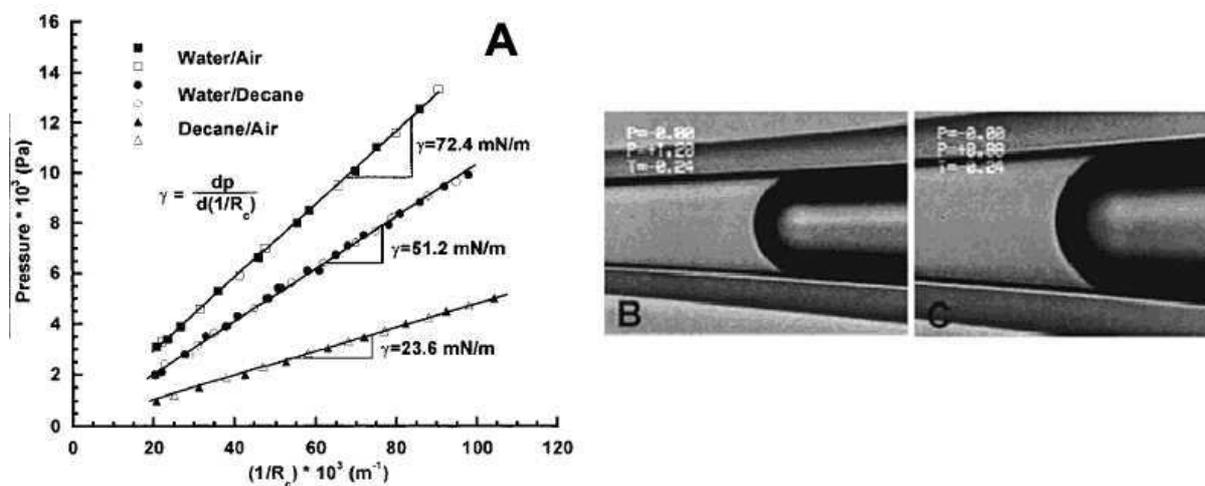


FIG. III.9: L'interface se déplace le long de la micropipette suivant la pression qui est exercée sur la micropipette [Lee, 2001].

Interface	Tension interfaciale (mN/m)	
	micropipette	littérature
Eau/nHeptane	49,8 (T=24°C)	51,9 (T=22°C)
Eau/nHexane	46,8 (T=24°C)	51,4 (T=22°C)
Eau/Chloroforme	32,6 (T=24°C)	32,7 (T=23°C)

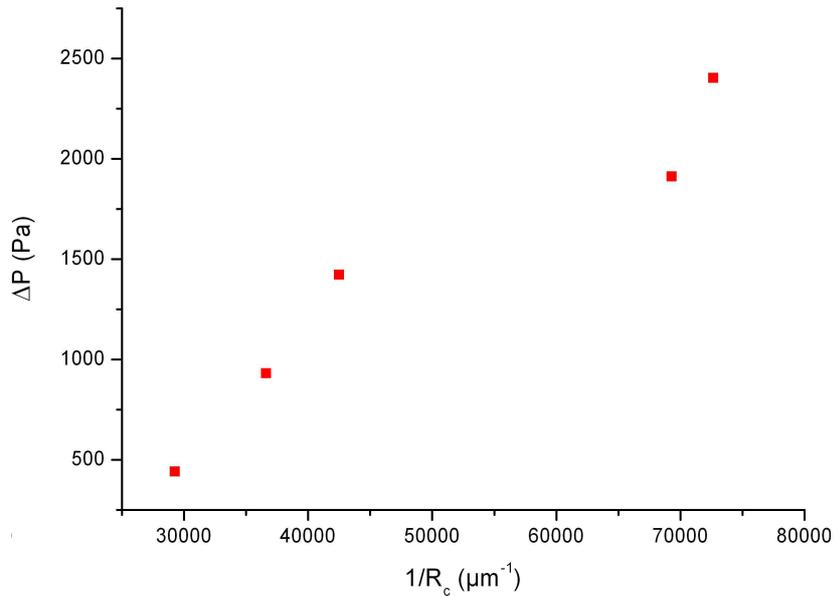


FIG. III.10: Détermination de la tension interfaciale Huile/VCA par analyse du rayon de courbure en fonction de la pression ΔP exercée sur la micropipette.

des liquides purs comme cela était le cas lors des mesures de contrôle. Si on analyse cette courbe, on trouve que $\gamma_{\text{Huile/VCA}} = 12,5 \text{ mN/m}$. Au cours du temps, lorsque la VCA se met à la surface de l'huile, elle diminue la tension interfaciale entre les deux liquides. Pour une pression donnée exercée sur la micropipette, on devrait donc observer l'interface qui sépare les deux liquides se déplacer vers les zones de plus petit diamètre au sein de la micropipette. Or, on observe assez souvent que l'interface se déforme sans avancer. Nous verrons en utilisant la technique de la goutte pendante que cette mesure de $12,5 \text{ mN/m}$ est largement surestimée.

Limites de la technique

Le principal obstacle que nous avons rencontré a été le problème de l'adhésion des protéines issues des extraits cellulaires ou de la VCA sur les parois de la micropipette. Ces protéines changent les propriétés de mouillage des liquides sur la paroi et gênent ainsi le libre déplacement des liquides dans la pipette. On se rend notamment bien compte de ce phénomène lorsque l'on augmente la pression hydrostatique, on observe du « stick slip », c'est à dire qu'au lieu d'avoir un mouvement continu de l'interface quand on change la pression, on voit dans un premier temps que cette interface ne bouge pas puis elle avance par une saccade. Ce phénomène fausse les mesures car il fausse la mesure de Rc . Bien que nécessitant plus de produit pour leur réalisation, nous avons du recourir aux techniques de la goutte montante et de la goutte pendante pour déterminer les tensions interfaciales nécessaires à

notre étude.

III.3.2.2 Goutte pendante et goutte montante

Ces deux méthodes sont basées sur la forme que prend une goutte de liquide à l'équilibre suspendue au bout d'un capillaire. En effet, La tension interfaciale entre deux liquides peut être calculée à partir de l'étude du contour d'une goutte présentant une symétrie de révolution (figure III.11). Nous allons décrire le principe de la goutte pendante en gardant à l'esprit que les mêmes forces sont en jeu pour la goutte montante. En effet, dans nos expériences, l'huile est le liquide le moins dense et que nous possédons en grande quantité. Nous avons donc opté quand cela s'est avéré possible pour la goutte pendante qui nécessite l'utilisation de moins de matériel biologique.

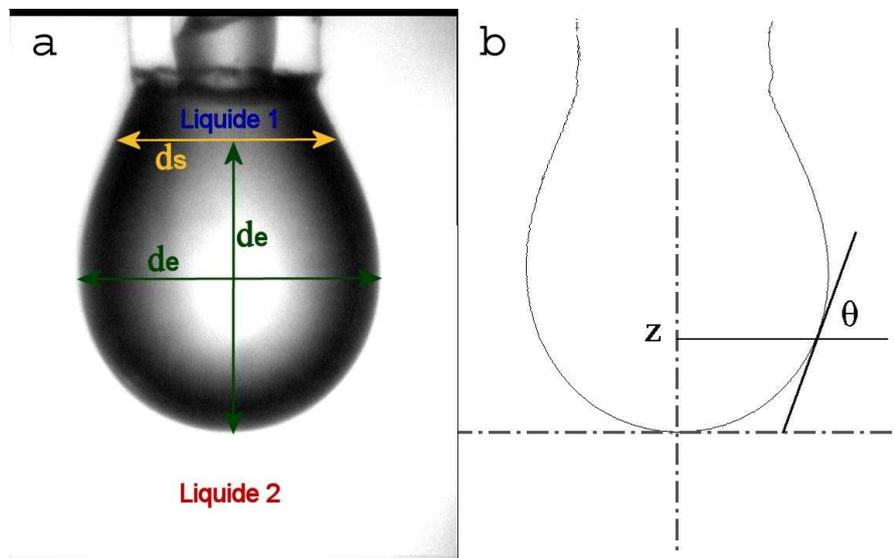


FIG. III.11: La goutte du liquide le plus dense pend au bout d'un capillaire dans le liquide le plus léger. a) La mesure du plus grand diamètre d_e de la goutte et du diamètre d_s caractérise la forme de la goutte et permettent de déterminer la tension interfaciale. b) Profil externe de la goutte sur lequel un logiciel va résoudre l'équation de Young-Laplace en tout point pour déterminer la tension interfaciale

La forme de la goutte est déterminée par la combinaison de la tension interfaciale et des effets de la gravitation. Les effets de la tension interfaciale forcent la goutte de *liquide 1* à minimiser sa surface de contact avec le *liquide 2* et donc à tendre vers la forme sphérique tandis que les effets de la gravitation qui dépendent du volume de la goutte ont tendance à l'allonger pour lui donner une forme en poire. Lorsque l'importance de ces effets est de

même ordre, la goutte ne tombe pas et atteint une position d'équilibre. La forme qu'adopte la goutte obtenue permet de déterminer la tension superficielle entre les deux liquides. La physique du système est donnée par deux équations fondamentales :

- l'équation de Young-Laplace cité précédemment qui traduit que, en tout point de la surface, la différence de pression ΔP causée par la courbure de la surface est proportionnelle aux rayons de courbures de l'interface, ainsi qu'à la tension interfaciale γ entre les deux liquides.
- la deuxième équation résulte de l'équilibre des forces au travers de tout plan horizontal :

$$2\pi x\gamma \sin \theta = V\Delta\rho g + \pi x^2 p$$

$$\text{Où } \left\{ \begin{array}{ll} p & \text{est la pression engendrée par la courbure} \\ \gamma & \text{la tension interfaciale} \\ R_1 \text{ et } R_2 & \text{les rayons de courbures principaux de la surface} \\ x & \text{l'abscisse du point de la méridienne d'ordonnée } z \\ \theta & \text{l'angle entre la normale et l'axe de révolution} \\ V & \text{le volume du fluide sous le plan} \\ \Delta\rho & \text{la différence des masses volumiques respectives des deux fluides} \\ g & \text{l'accélération de la pesanteur} \end{array} \right.$$

L'analyse peut se faire de deux manières. La première est semi-empirique et consiste à mesurer le plus grand diamètre horizontal d_e de la goutte et le diamètre d_s obtenu en reportant d_e suivant l'axe vertical de la goutte et en mesurant la largeur de la goutte à cette ordonnée (figure III.11a). Le rapport $S=d_e/d_s$ permet de connaître le facteur de forme H en regardant dans les tables qui donnent $1/H$ en fonction de S . [Adamson, 1990]. La tension superficielle $\gamma(N.m^{-1})$ est alors donnée par :

$$\gamma = \frac{\Delta\rho g d_e^2}{H}$$

Il existe des logiciels qui résolvent les équations, directement sur les images, en chaque point du profil de la goutte et donnent directement la tension interfaciale. Nous avons pour notre part utilisé les deux méthodes.

Dispositif expérimental

Le dispositif est présenté sur la figure III.12b. Pour la formation des gouttes, nous disposons d'un système composé d'une seringue micrométrique d'un volume de 2 ml relié à un pousse seringue par un tuyau en silicone, l'aiguille est à bout plat non biseauté en acier inoxydable, de 0.9 mm de diamètre extérieur et de 0.5 mm de diamètre intérieur. Les images de gouttes sont acquises par une caméra CCD refroidie (CoolSNAP fx, Photometrics) pilotée

par un logiciel d'acquisition (MetaMorph, Universal Imaging Corporation). Pour obtenir un bon contraste de l'image, on utilise un éclairage diffus obtenu en plaçant une fibre optique reliée à une lampe derrière une plaque de verre diffusante (figure III.12b(2)). L'utilisation de la fibre optique évite également le réchauffement de l'échantillon par l'éclairage.

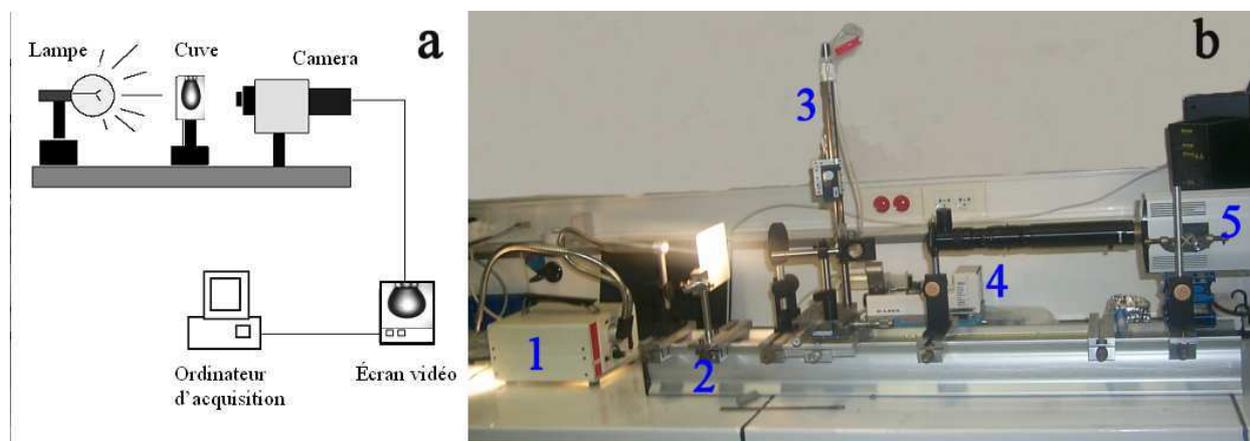


FIG. III.12: a) Schéma du dispositif expérimental. b) Alignés sur un banc optique on a successivement : la lampe à fibre optique(1), le verre diffuseur (2), la seringue (3) reliée au pousse seringue (4) et la caméra (5)

Nous travaillons dans une pièce dont la température est maintenue à 23°C.

Mesures

Nous avons dans un premier temps observé comment la VCA s'adsorbe à la surface de l'huile et son influence sur la tension interfaciale. Lorsque l'on prépare l'émulsion dans le cadre de nos expériences, on laisse celle-ci incuber environ 1h30 dans une solution tamponnée de borate contenant la protéine VCA pour que cette dernière aille se mettre à l'interface avec l'huile. On se place dans des conditions similaires pour observer l'évolution de la tension interfaciale entre le tampon contenant la VCA et l'huile lorsque la protéine vient se mettre à l'interface. En utilisant la technique de la goutte pendante, on laisse pendre une goutte de tampon contenant la VCA dans une cuve remplie d'huile (figure III.13).

On voit qu'en présence de VCA, après un peu plus d'une heure d'incubation, la tension interfaciale décroît jusqu'à arriver à un plateau à 8 mN/m. A titre de contrôle, on mesure également la tension interfaciale entre le tampon borate et l'huile, on observe que celle-ci se stabilise aux voisinages de 25 mN/m, soit une valeur bien supérieure à celle obtenue en présence de VCA. On remarque que les profils de décroissance en présence de VCA sont quasiment identiques pour les deux concentrations en VCA mesurées (figure III.13). Cela suggère

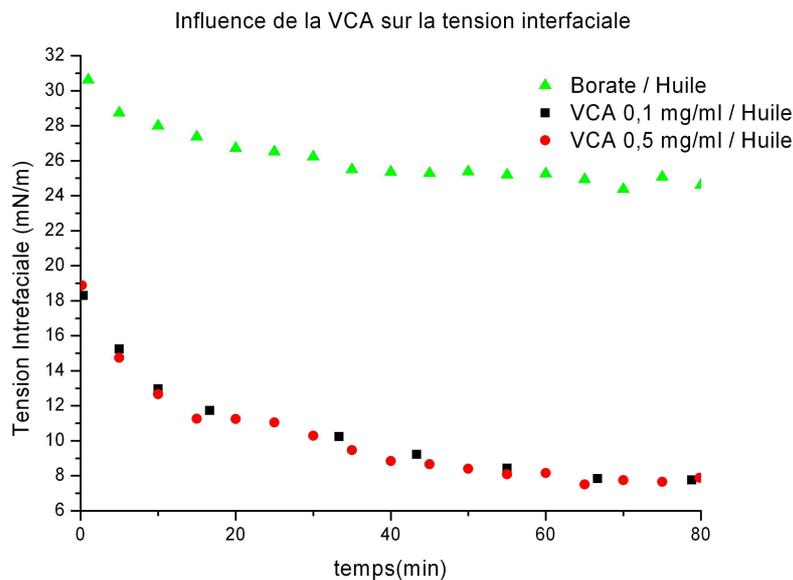


FIG. III.13: Influence du greffage de la VCA à la surface de l'huile sur la tension interfaciale

que l'on travaille dans des gammes de concentration en VCA pour lesquelles la quantité finale de VCA présente sur les gouttes d'huile ne dépend quasiment pas de la concentration en VCA de la solution d'incubation.

On s'intéresse maintenant à l'effet sur la tension interfaciale des protéines amphiphiles présentes dans les extraits cellulaires Hela S3 que nous utilisons dans nos expériences. Pour ce faire, on utilise la goutte montante, une goutte d'huile au bout d'une seringue baigne dans des extraits cellulaires (figure III.14). Pour éviter la polymérisation de l'actine lors de la mesure, et puisque nous voulons ici mesurer uniquement la tension interfaciale sans l'effet de l'actine, les extraits cellulaires sont complétés avec $30 \mu\text{M}$ de *Latrunculine A*, une drogue qui inhibe la polymérisation de l'actine [Coue, 1987; Morton, 2000].

On constate que les protéines amphiphiles présentes dans les extraits Hela ont un effet plus important sur la tension interfaciale que la VCA, puisque la tension interfaciale entre l'huile et les extraits diminue jusqu'à 4 mN/m . On peut donc penser que dans nos expériences, la tension interfaciale est contrôlée par les protéines provenant des extraits cellulaires.

Nous avons voulu vérifier que la présence de VCA à la surface des gouttes ne gêne pas l'insertion des molécules provenant des extraits cellulaires. Pour cela, on procède en deux étapes, la première consiste à laisser une goutte d'huile au bout d'une seringue tremper dans une solution de VCA jusqu'à ce que la tension interfaciale n'évolue plus (cf. courbe en noire

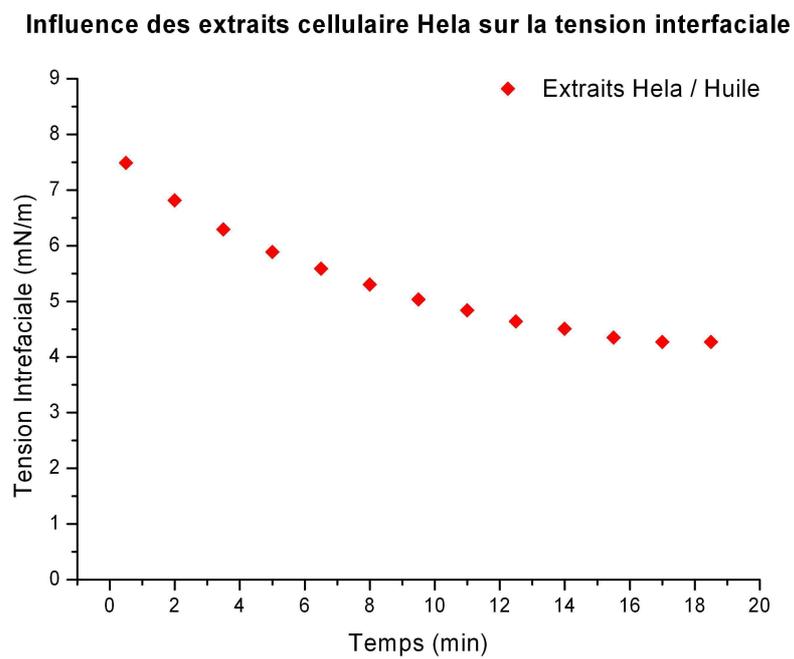


FIG. III.14: Influence des protéines présentes dans les extraits Hela sur la tension interfaciale extraits cellulaires/huile

de la figure III.15), on ajoute à ce moment là des extraits cellulaires pour voir l'évolution de la tension interfaciale. On observe qu'en présence d'extraits, elle se remet à décroître jusqu'à environ 4mN/m cf. courbe en rouge de la figure III.15). La présence de VCA à la surface de l'huile ne semble pas gêner l'insertion des molécules amphiphiles provenant des extraits. Cela n'était pas complètement inattendu dans la mesure où, lorsqu'il y a formation d'une comète d'actine sur une goutte, la densité de filaments d'actine associés à la surface d'huile (*via* VCA) est suffisamment faible pour que d'autres protéines puissent s'intercaler.

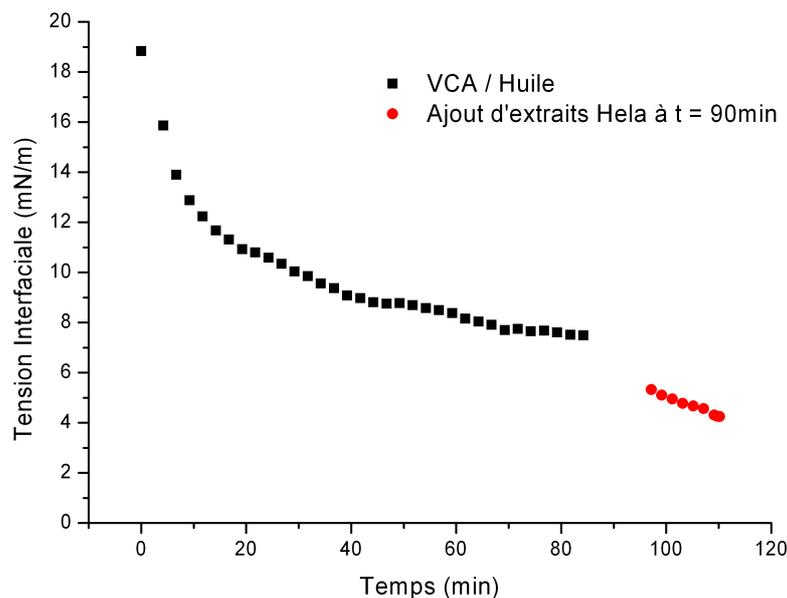


FIG. III.15: Mise en évidence de l'adsorption des protéines amphiphiles issues des extraits cellulaires lorsque la protéine VCA est déjà présente à la surface des gouttes d'huile

III.3.3 Conclusion

Nous venons de montrer que bien que la présence de la protéine VCA à la surface des gouttes d'huiles abaisse la tension interfaciale, ce sont les protéines provenant des extraits cellulaires et qui se mettent à la surface de l'huile qui contrôlent la tension interfaciale dans notre système. Bien que l'on ait observé expérimentalement qu'au cours de la formation de la comète d'actine, la VCA colocalise avec la région de la comète, on considère dans la suite que cela n'a pas pour effet d'avoir des tensions interfaciales différentes dans la région de la comète et dans celle dépourvue en VCA. Même si la concentration de la protéine VCA dans

la région de la comète change la tension interfaciale, l'effet doit en être minime car comme nous venons de le voir, la présence de VCA ne gêne pas l'addition des protéines issues des extraits cellulaires à la surface de la goutte d'huile. On peut donc considérer que la tension interfaciale est quasiment homogène le long de la goutte et qu'elle vaut $\gamma=4\pm 0.5$ mN/m.

III.4 Déformation de vésicules lipidiques

Afin d'observer les forces induites par la polymérisation de l'actine, parallèlement à nos études utilisant des gouttes d'huile, deux groupes, celui de J. Theriot à Stanford et celui de A. Van Oudenaarden au MIT ont entrepris la mise au point de vésicules phospholipidiques artificielles fonctionnalisées en intercalant périodiquement dans la membrane la protéine *ActA* issue de la bactérie *Listeria Monocytogenes*. Dans les deux cas, lorsque ces vésicules sont mises dans des extraits cellulaires, elles recrutent l'actine pour former une comète et se mettent en mouvement comme dans le cas de la *Listeria*. Nous allons successivement décrire leurs observations.

III.4.1 Forces de compressions générées par une comète d'actine sur une vésicule lipidique [Giardini, 2003]

L'équipe de J. Theriot a regardé la polymérisation de l'actine autour de vésicules de diamètre compris entre 0,5 et 10 μm dans des extraits cytoplasmiques d'œuf de *Xenopus*. Ces observations ont mis en évidence différents comportements possibles (figure III.16). Ils observent assez souvent la formation de tubes de membrane à l'arrière de la vésicule (figure III.16 A et B). La partie avant se casse parfois, libérant ainsi une vésicule libre qui se déplace par polymérisation de l'actine.

L'analyse de la forme de la goutte a été faite pour des vésicules du type de celle que l'on peut voir sur la figure III.16 B et C. En l'absence de la protéine *ActA* à la surface de la vésicule, celle-ci adopte plusieurs géométries, en majorité elle reste sphérique ou prend la forme d'une ellipsoïde et dans 7% des cas, la vésicule a une forme en poire comme lorsqu'elle est déformée par la comète d'actine. En présence d'*ActA* à la surface des vésicules, 98% des vésicules ont un profil en forme de poire sous l'action de l'actine. Cela met en évidence la pression qu'exerce le gel d'actine sur la membrane (figure III.16 C). Pour estimer la force exercée par le gel d'actine sur la vésicule, l'auteur écrit l'équation de Laplace en tout point du profil de la membrane et suppose que la pression interne de la vésicule P_0 due à la pression osmotique est constamment balancée par la pression P due à la tension de la membrane et la pression P_n exercée par le gel d'actine, de sorte que $P_0 = P_n + P$. Il en résulte l'expression de P_n . Le calcul de la répartition des pressions est ensuite effectué à partir du profil d'une « vésicule canonique », c'est à dire de la forme moyenne que prend la vésicule au sein d'une population de vésicules. L'actine exerce une force compressive sur les côtés de la vésicule et tire à l'arrière. Une estimation de la force de compression qu'exerce l'actine est obtenue en

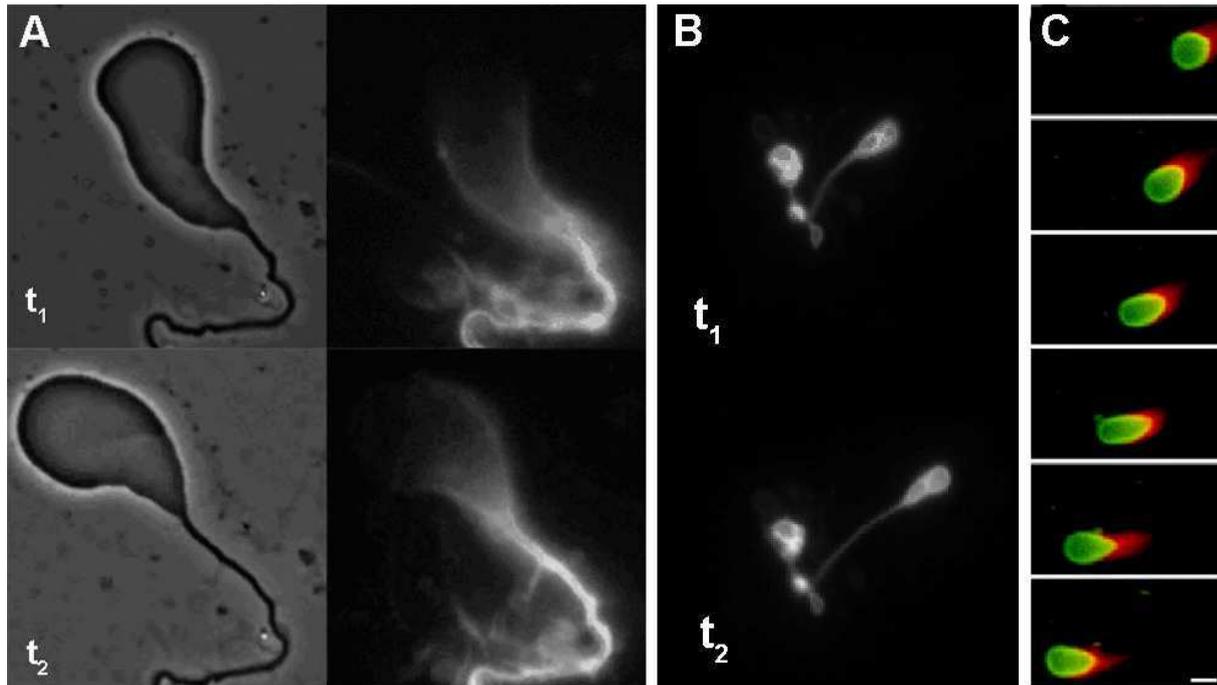


FIG. III.16: Vésicules lipidiques déformées par la polymérisation de l'actine à leur surface, la protéine *ActA* est marquée à la fluorescéine. A) Formation d'un tube de membrane à l'arrière de la vésicule. On remarque que la membrane ne semble pas réellement sous tension. B) La vésicule bouge ici de façon quasi linéaire en formant un tube de membrane. C) La forme de la vésicule varie au cours du temps; l'actine est marquée à la rhodamine et les lipides à la fluorescéine. [Giardini, 2003].

intégrant la composante normale à la vésicule de P_n . Pour pouvoir intégrer, la tension de la membrane est considérée comme une constante, nous verrons dans la troisième partie de la thèse qu'un tel raisonnement ne peut pas conduire à la force qu'exerce le gel.

Les principaux problèmes que posent ce système résident dans plusieurs points. Le premier, comme le fait remarquer l'auteur, provient du fait qu'il ne peut pas mesurer la tension γ de ses vésicules, il ne peut donc en faire qu'une estimation. La détermination de corrélation entre les différents paramètres du système tels que la déformation, la vitesse et la taille des vésicules s'est avérée infructueuse. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce manque de corrélation est la variabilité de la tension de membrane au sein d'une population de vésicules qui masquerait les dépendances entre les différents paramètres. On peut également penser que le fait d'analyser les vésicules qui se déplacent en tirant un tube augmente certainement la difficulté à trouver des corrélations. Il a également été constaté par les auteurs, que le volume de la vésicule diminue au court de l'expérience à cause de l'eau qui peut passer à travers la membrane lipidique. Si la vésicule en réponse à la compression due à l'actine rejete de l'eau au lieu de tendre la membrane, cela rend encore plus difficile l'interprétation des résultats sur le calcul de la force.

III.4.2 Mise en évidence des forces induites par polymérisation de l'actine sur une vésicule lipidique [Upadhyaya, 2003]

Le système mis au point par l'équipe de Van Oudenaarden est sensiblement identique à celui que l'on vient de présenter. Il semble en revanche plus stable, car les auteurs ne font pas mention d'étirement de tube de membrane, ce qui peut nous laisser penser que la tension de membrane est certainement mieux contrôlée ici. Mais les problèmes innérents à l'utilisation de vésicules reste entier, à savoir notamment que la perméabilité de la membrane rend la connaissance de la tension de membrane très délicate. Ils ont également observé lors du déplacement de la vésicule que celle-ci est de plus en plus déformée au court du temps jusqu'à atteindre un maximum de déformation puis en un temps très court, elle reprend une forme quasi sphérique. Le mouvement est donc un mouvement saltatoire caractérisé par un cycle d'environ 7 minutes dans le cas présent (figure III.17).

Lorsque la vésicule reprend une forme sphérique, on peut voir sur la figure III.17a et b, que c'est l'arrière de la vésicule qui a la plus grande vitesse, ce qui montre que la vésicule doit se désolidariser de la comète d'actine et relaxer vers l'état sphérique qui est le plus stable. Les auteurs pensent que la rupture survient lorsque la force de traction exercée par l'actine à l'arrière de la vésicule devient plus forte que la liaison qui lient la protéine *ActA*

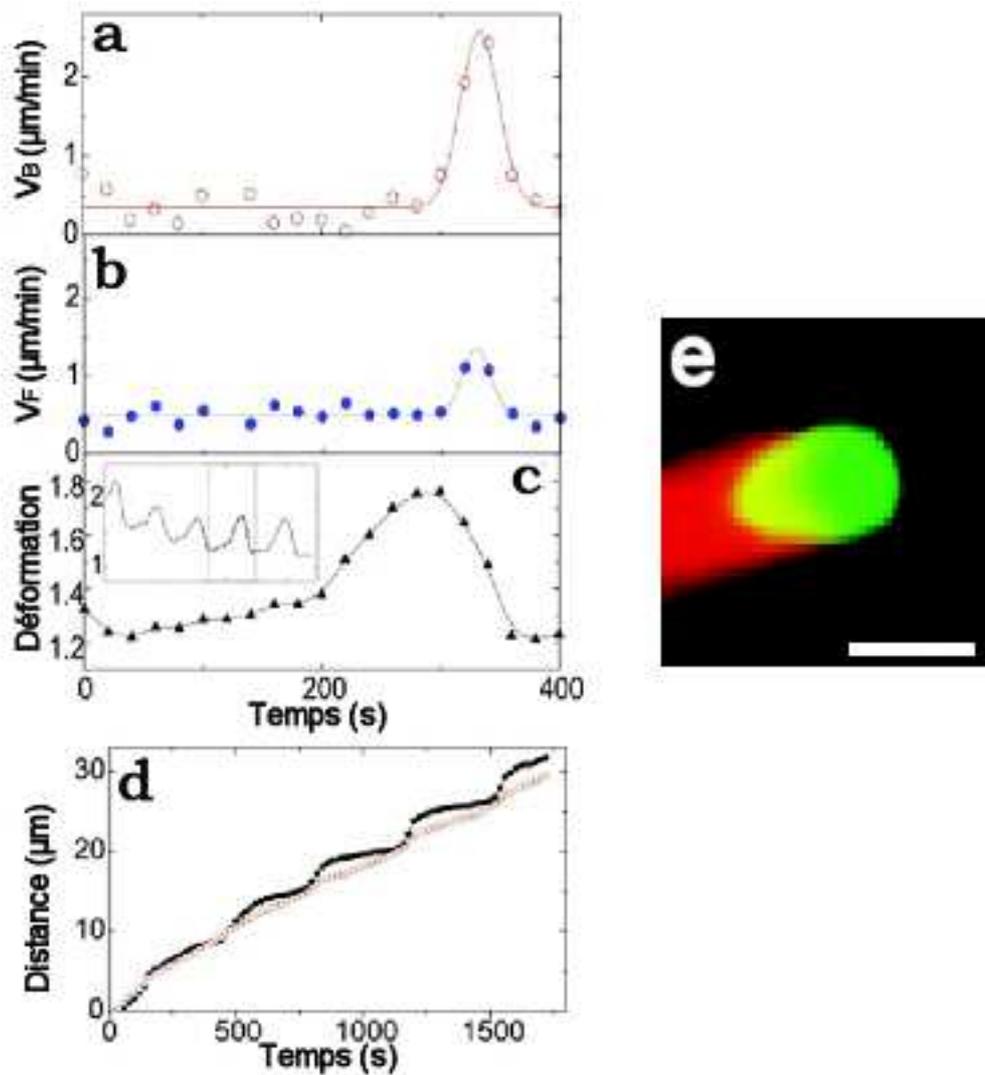


FIG. III.17: Caractéristiques du mouvement d'une vésicule propulsée par une comète d'actine. a) Vitesse V_B de l'extrémité arrière de la vésicule, b) Vitesse V_B de l'extrémité avant de la vésicule, c) Déformation de la vésicule au court du temps, elle est définie comme le rapport entre la plus grande longueur L sur la plus grande largeur l perpendiculairement à L , d) Distance parcourue au court du temps, on voit que le caractère périodique du mouvement, e) Vésicule propulsée par une comète d'actine, l'actine apparaît en rouge et la vésicule est en vert (barre $3\mu\text{m}$). [Upadhyaya, 2003]

à la membrane. Ceci limite la plage des contraintes exercées par le gel d'actine que peut explorer ce système.

III.5 Observations expérimentales et modélisation

En regardant le comportement expérimental de gouttes de différentes taille, en mesurant leur vitesse et leur déformation, nous avons tenté de comprendre les corrélations qui peuvent exister entre ces différents paramètres. Un modèle théorique expliquant la forme en poire prise par les gouttes sous l'effet de l'actine a été élaboré à partir de ces observations.

III.5.1 Etat stationnaire

On peut décomposer le processus qui mène à la formation de la comète d'actine en trois étapes. Dans un premier temps, le gel d'actine polymérise en symétrie sphérique autour de la goutte, le rapport a/b est alors égal à 1. La seconde phase correspond à l'apparition d'une fracture dans le gel, ce qui conduit *in fine* à la formation de la comète. A la fin de cette étape, la goutte a une forme en poire qui n'évolue quasiment plus et elle se déplace à une vitesse constante. Durant cette étape où la goutte n'a pas encore atteint son état stationnaire, elle adopte différentes formes intermédiaires. Il peut alors arriver, mais cela n'est pas toujours le cas, que la goutte adopte la forme d'un ellipsoïde pour lequel le facteur a/b est particulièrement bas. On peut voir sur la figure III.18 un exemple de l'évolution du rapport a/b en fonction du temps jusqu'à atteindre l'état stationnaire.

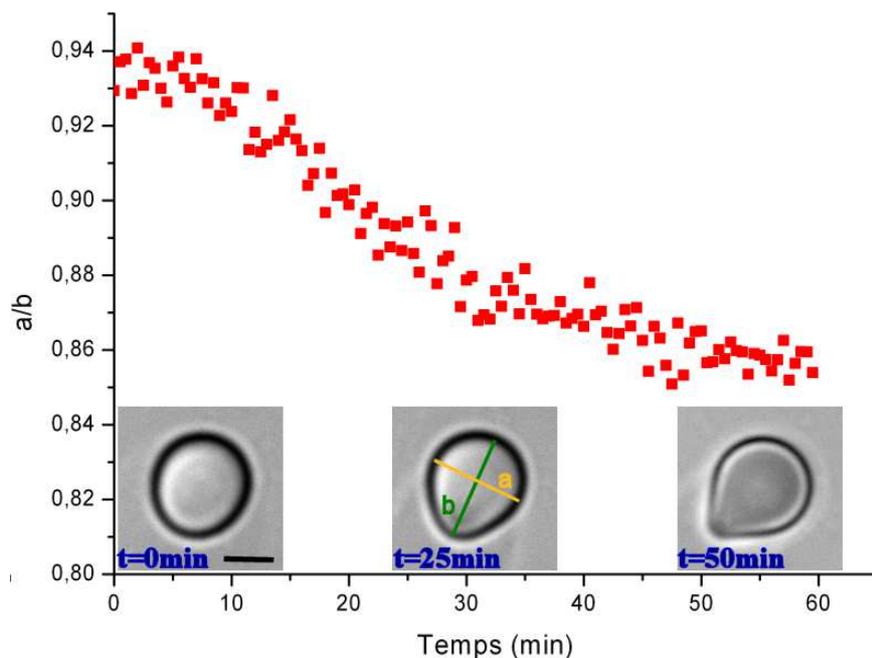


FIG. III.18: Evolution de la déformation de la goutte avant qu'elle atteigne son état stationnaire. Barre $3\mu\text{m}$

Afin de pouvoir comparer plusieurs expériences entre elles pour trouver des corrélations entre les différents paramètres du système (vitesse, taille, déformation), nous avons observé les gouttes une fois qu'elles ont atteint leur état stationnaire. On peut remarquer que dans les études menées en utilisant des vésicules lipidiques à la place de la goutte d'huile, l'état stationnaire n'est jamais atteint, ils observent un mouvement saltatoire où la vésicule est de plus en plus déformée dans un premier temps avant de reprendre brusquement une forme sphérique. Les auteurs de cette étude pensent que la vésicule reprend sa forme sphérique lorsque la force qui tire sur la partie arrière de la vésicule atteint une valeur critique au-delà de laquelle les liens entre les filaments d'actine qui constituent la comète et la membrane lipidique cèdent [Upadhyaya, 2003]. Cela limite la gamme des contraintes exercées par l'actine que sont capables d'explorer les systèmes utilisant des vésicules.

III.5.2 Taille et déformation

Pour un objet qui passe d'une forme sphérique à une forme en poire, il existe deux méthodes simples pour caractériser la déformation. La première étant de mesurer le rapport a/b entre la distance b qui sépare les deux points les plus éloignés de la surface de la goutte et la distance a entre les deux points les plus éloignés perpendiculairement à l'axe formé par b (figure III.19a). La forme que prend la goutte étant quasiment conique, on peut également caractériser la déformation à l'aide de l'angle θ_0 que forme l'axe de symétrie de la goutte avec la partie linéaire du cône de déformation (figure III.19b).

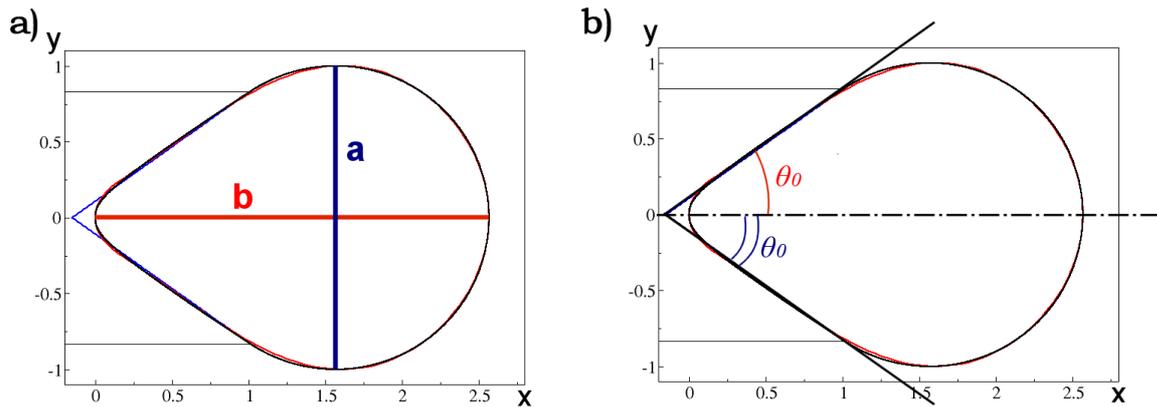


FIG. III.19: Analyse du profil d'une goutte déformée par un gel d'actine : a) Par la mesure du rapport a/b , b) Par la mesure de l'angle θ_0

Par ces deux méthodes, l'expérience nous montre que plus la goutte est petite, moins

elle est déformée. La plus simple à mettre en œuvre est la mesure de a/b , particulièrement quand la déformation de la goutte ne forme pas un cône bien défini (figure III.20)

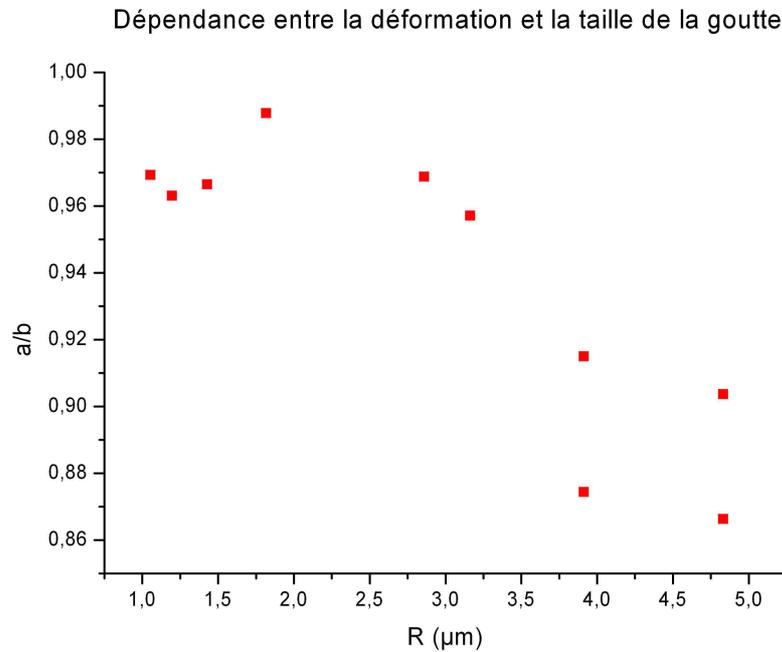


FIG. III.20: Déformation de la goutte par l'actine en fonction de son rayon R

On voit sur la figure III.20 que les petites gouttes (de l'ordre du micron) ne sont quasiment pas déformées (a/b est très proche de 1), contrairement aux gouttes de plus grand rayon. De façon qualitative, Cela s'explique en raisonnant sur la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte. Nous avons vu en effet que cette différence de pression ΔP entre l'huile contenue dans la goutte et le liquide qui l'entoure est inversement proportionnelle au rayon de cette goutte. La pression à l'intérieur de la goutte est donc d'autant plus importante que la goutte est de petite taille. Il faudra donc exercer des contraintes plus importantes pour déformer une petite goutte qu'une grande. Nous verrons avec l'analyse théorique présentée au paragraphe suivant, que l'on retrouve cette dépendance de la déformation en fonction du rayon.

III.6 Analyse élastique de la déformation

III.6.1 Présentation du modèle

Le but est ici de comprendre le mécanisme de production des forces élastiques exercées par l'actine pour déformer la goutte d'huile. L'analyse présentée ici a été élaborée en collaboration avec les théoriciens O. Campàs, J.F. Joanny et J. Prost du laboratoire. Nous verrons que dans ce système, la connaissance de la tension interfaciale et la conservation du volume permet une analyse quantitative de la forme observée, ainsi qu'une détermination de la distribution des contraintes élastiques qu'exerce l'actine sur la goutte. La description du modèle peut se décomposer en deux étapes. Dans un premier temps, nous écrirons les équations qui permettent de décrire la forme en poire qu'adopte la goutte, et dans un deuxième temps nous regarderons le calcul de la force de propulsion ainsi que la répartition des contraintes qu'exerce le gel d'actine le long du profil de la goutte.

III.6.1.1 Détermination de la forme

Les paramètres physiques qui contrôlent l'aspect de la goutte sont la différence de pression qui existe entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte d'une part, et les contraintes qu'exerce le gel sur la goutte lorsqu'il polymérise d'autre part. Dans le but de donner une description théorique de la forme de la goutte, elle est paramétrée par l'épaisseur d'huile h et par l'angle local θ formé par la tangente à la goutte et à la direction du mouvement (figure III.21).

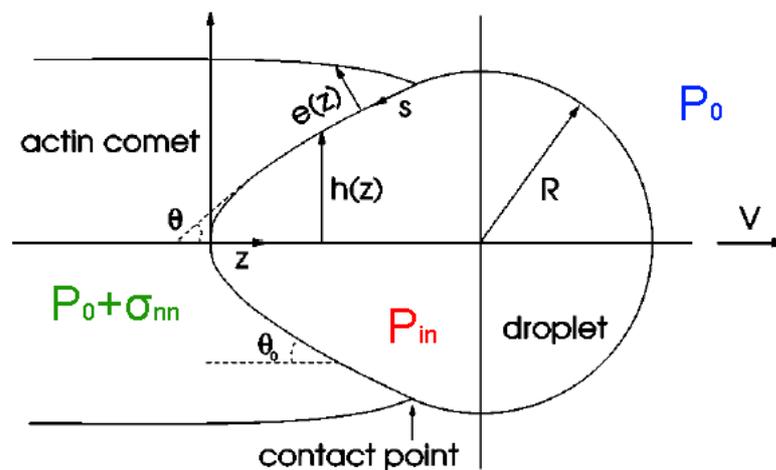


FIG. III.21: Paramétrisation de la forme de la goutte

La différence de pression est décrite par l'équation de Laplace. A l'interface avec les extraits, sur la partie sphérique de rayon R , elle s'écrit $P_{in} = P_0 + 2\gamma_0/R$, où P_{in} est la pression à l'intérieur de la goutte et P_0 est la pression dans le liquide environnant, γ_0 est la tension interfaciale dont on a déterminé la valeur expérimentalement $\gamma_0 = 4 \pm 0,5 mN/m$ (cf. III.3). Dans la région de la comète, l'interface est alors caractérisée par deux rayons de courbure, et en tout point d'épaisseur h , les contraintes locales exercées sur la goutte doivent être balancées. Dans cette région, la loi de Laplace s'écrit

$$P_{int} = P_0 + \gamma_0 \left(\frac{\cos \theta(h)}{h} + \frac{d \cos \theta(h)}{dh} \right) - \sigma_{nn}(h)$$

où $\sigma_{nn}(h)$ est la contrainte normale à la surface de la comète exercée par la goutte ($\sigma_{nn}(h)$ positive signifie que la comète tire sur la goutte, et $\sigma_{nn}(h)$ est négative lorsque la comète appuie sur la goutte).

De ces deux équations, on tire une première expression reliant la contrainte $\sigma_{nn}(h)$ au profil de la goutte décrit par l'angle $\theta(h)$

$$\frac{2\gamma_0}{R} = \gamma_0 \left(\frac{\cos \theta(h)}{h} + \frac{d \cos \theta(h)}{dh} \right) - \sigma_{nn}(h) \quad (\text{III.1})$$

La contrainte $\sigma_{nn}(h)$ sur le gel influe sur les cinétiques de polymérisation à la surface de la goutte. La polymérisation s'effectue suivant l'axe normal à la surface de la goutte, elle est accélérée lorsque le gel tire sur la goutte, et ralentie par une contrainte compressive. Les théories classiques sur les vitesses de polymérisation prévoient que la vitesse de polymérisation v_p varient suivant une loi de Boltzmann [Eyring, 1935 ; Kramers, 1940] :

$$v_p(h) = v_p^0 \exp [\sigma_{nn}(h)/\sigma_0] \quad (\text{III.2})$$

Avec $\sigma_0 \equiv kT/a^2\delta$, a est la distance entre promoteurs de polymérisation d'actine (VCA ici) à la surface de la goutte, δ est de l'ordre de la taille d'un monomère d'actine et v_p^0 est la vitesse de polymérisation en l'absence de contrainte.

La dernière équation pour déterminer la forme de la goutte est la conservation du volume du gel lors de la polymérisation. En première approximation, on considère que la densité du gel est constante et que la comète est un cylindre parfait. A l'état stationnaire, la goutte avance à vitesse constante V . L'épaisseur de gel locale e est alors telle que $de/ds = \tan \theta$ où s est l'abscisse curviligne qui suit le contour de la goutte. Avec cette approximation, la vitesse locale de polymérisation est reliée à la vitesse d'avancement par la relation :

$$v_p(h) = V \sin \theta(h) \quad (\text{III.3})$$

En utilisant la mesure expérimentale de la vitesse V de la goutte, les équations III.1 à III.3 déterminent la forme de la goutte. Dans la partie où h est de l'ordre de R , la contrainte $\sigma_{nn}(h)$ est faible et peut être négligée. Le profil de la goutte décrit alors un cône d'angle θ_0 tel que $v_p^0 = V \sin \theta_0$. La mesure de θ_0 donne ainsi accès à la vitesse de polymérisation v_p^0 en l'absence de contrainte élastique. En appliquant ce résultat aux profils de gouttes obtenus expérimentalement on obtient (figure III.22)

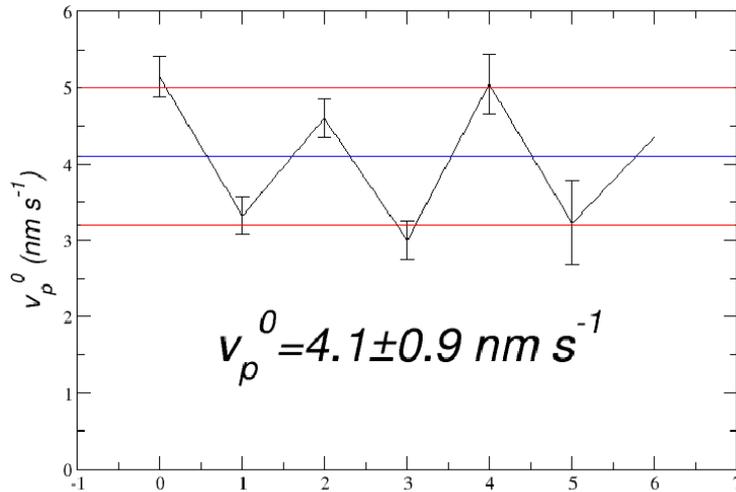


FIG. III.22: Mesure de la vitesse de polymérisation en l'absence de contrainte. L'axe des abscisses représente les différentes gouttes sur lesquelles ont été fait la mesure

Expérimentalement on a pu constater que la valeur de la polymérisation en l'absence de contraintes est très sensible au lot d'extrait cellulaire utilisé, cela est certainement dû aux variations de dilution et de concentration des protéines présentes dans les extraits cellulaires et qui varient d'une préparation à une autre comme nous l'avont fait remarquer précédemment.

Dans la région plus à l'arrière de la goutte, la forme de l'interface comète-goutte s'éloigne du cône pur quand le facteur de Boltzmann est significativement supérieur à 1. Cela permet de définir la région où on s'éloigne de l'approximation comme $l \equiv \gamma a^2 \delta / kT$ ce qui conduit à $\sigma_0 = \gamma / l$. Dans la suite on considère $\varepsilon \equiv l / R$ comme un nombre petit. Aux environs du point le plus en arrière de la goutte, le profil de la goutte est donné par $h^2 = 4lz / \log(1 / \sin \theta_0)$. Dans la pratique, on digitalise le profil de la goutte que l'on ajuste avec une courbe continue (figure III.23).

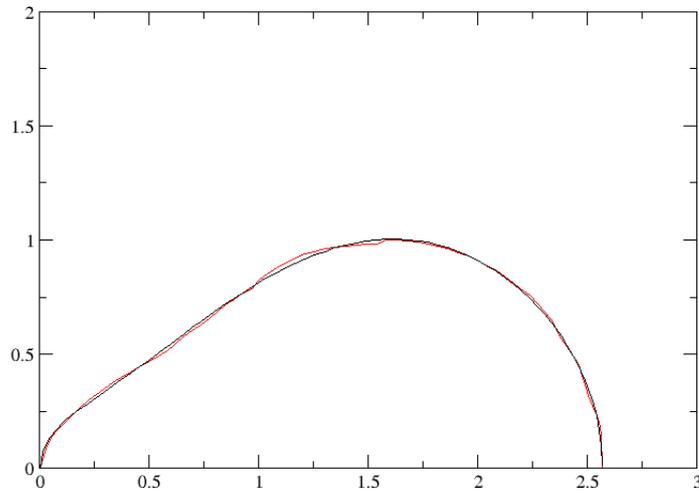


FIG. III.23: Digitalisation du profil expérimental de la goutte d'huile. R est utilisé comme unité de longueur.

On résout ensuite numériquement les équations III.1 et III.3 en utilisant R comme unité de longueur. Le profil dépend alors des deux paramètres sans dimension ε et $\sin \theta_0 = v_p^0/V$. On peut voir figure III.24 la comparaison entre le profil expérimental et le profil calculé.

III.6.1.2 Force de propulsion et contraintes.

La force élastique totale F_e exercée par la comète sur la goutte s'obtient en intégrant la projection de la composante normale de la contrainte élastique sur l'axe décrit par la direction du mouvement. La pression à l'intérieur de la goutte varie d'un point à un autre du fait du déplacement de la goutte qui crée un flux interne. La pression est donc différente de P_{in} et s'écrit $P = P_{in} + \delta P$, de même il existe certainement un léger gradient de la tension interfaciale le long du profil de la goutte (du fait de la répartition de la VCA), elle s'écrit donc $\gamma = \gamma_0 + \delta\gamma$. Pour la détermination de la forme de la goutte, nous avons fait l'approximation de négliger les variations de pression et de tension interfaciale, car ces variations sont très faibles et ne constituent pas un paramètre pertinent pour le calcul de la forme prise par la goutte. Si on tient compte maintenant de corrections sur la tension interfaciale et la pression, et qu'on les reporte dans l'équation (1), l'expression de la contrainte obtenue donne l'expression suivante pour la force de propulsion :

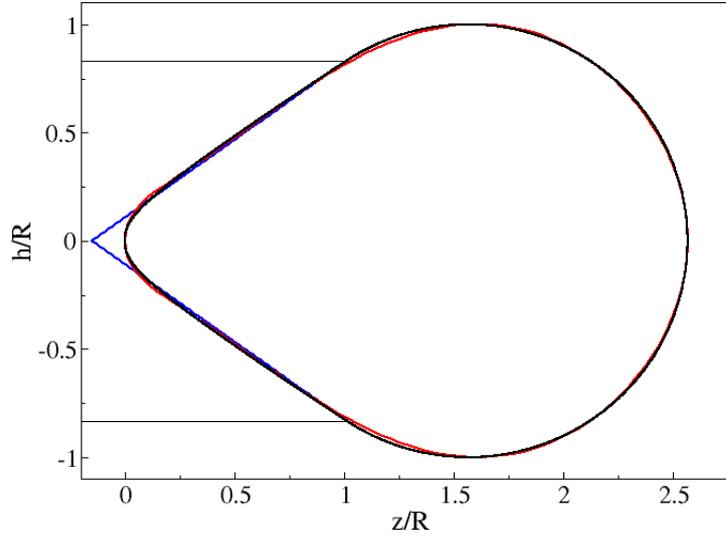


FIG. III.24: Comparaison du profil expérimental en noir avec le profil en rouge obtenu en résolvant les équations (1) et (3) numériquement. R est utilisé comme unité de longueur.

$$F_e/2\pi = \int_0^{h_m} dh h \left(\cos \theta \frac{d\delta\gamma}{dh} + \delta P \right) \quad (\text{III.4})$$

Si on ignore à la fois le gradient de pression et le gradient de tension de surface, la force de propulsion est alors égale à zéro. Ce résultat est général et vaut pour toutes les gouttes qui présentent une symétrie axiale, quelle que soit la distribution de contraintes élastique le long de la surface, indépendamment du n'importe quel modèle élastique de la comète et de la vitesse de polymérisation de l'actine. Dans leur article, Giardini et collaborateurs utilisent, pour estimer la force de propulsion, les hypothèses que la tension interfaciale ainsi que la pression à l'intérieur de leur vésicule est constante [Giardini, 2003]. Or comme on vient de le voir, de telles hypothèses rendent impossible l'estimation de la force de propulsion par ces modèles. La conséquence la plus importante de l'équation III.4 est que les mesures expérimentales de la force de propulsion doivent prendre en compte le gradient de tension de surface ainsi que la variation de pression créée par le flux à l'intérieur de la goutte.

Le profil en poire de la goutte implique que le gel tire la goutte à l'arrière et la comprime à l'avant. Dans la région de taille l à l'arrière de la goutte, la contrainte $\sigma_{nn}(h)$ est positive

et de l'ordre de γ/l . Au point arrière, $\sigma_{nn}(h=0) = \gamma \log(1/\sin \theta_0)/l$. Dans la région conique, la contrainte s'écrit à un ordre inférieur en ε :

$$\sigma_{nn}(h) = \frac{\gamma}{R} \left(-2 + \frac{R \cos \theta_0}{h} \right)$$

Elle est positive à l'arrière de la goutte (tirant la goutte vers l'arrière) et négative dans la partie plus avant (poussant la goutte vers l'avant), comme cela a également été remarqué dans la référence [Upadhyaya, 2003]. La contrainte s'annule pour une épaisseur $h = (R \cos \theta_0)/2$.

Si on applique cela à une goutte, on peut déterminer la distribution des contraintes le long du profil de la goutte (figure III.25)

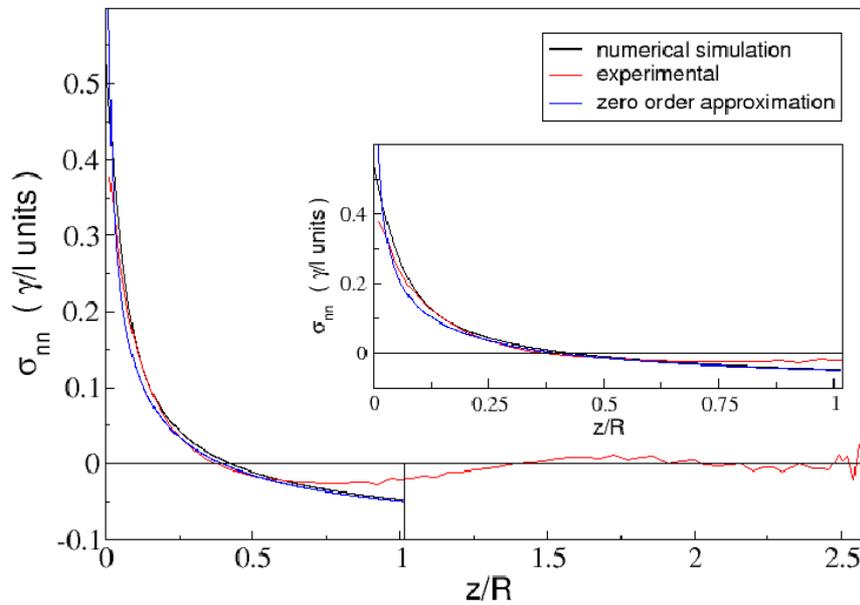


FIG. III.25: Répartition des contraintes le long du profil de la goutte. Au voisinage du point triple (goutte, comète, extraits cellulaire), on peut remarquer une divergence entre la contrainte prévue théoriquement et celle obtenue à partir du profil expérimental de la goutte.

III.6.1.3 Améliorations à apporter au modèle

Ce modèle présente l'avantage majeur de décrire avec très peu de paramètres la forme de la goutte et de mesurer les contraintes qu'exerce le gel d'actine sur la goutte. En revanche, il n'est, à l'heure actuelle, pas capable de prédire certains comportements que l'on observe expérimentalement.

En effet, nous avons observé expérimentalement, qu'à partir d'une certaine taille de goutte ($\approx 5\mu\text{m}$ de rayon), la forme en poire qu'adopte habituellement la goutte d'huile n'est plus un état stationnaire du système. Le gel d'actine qui « pincent » l'huile à l'arrière de la gouttelette, finit par tirer un « tube » comme on peut le voir sur la figure III.26.

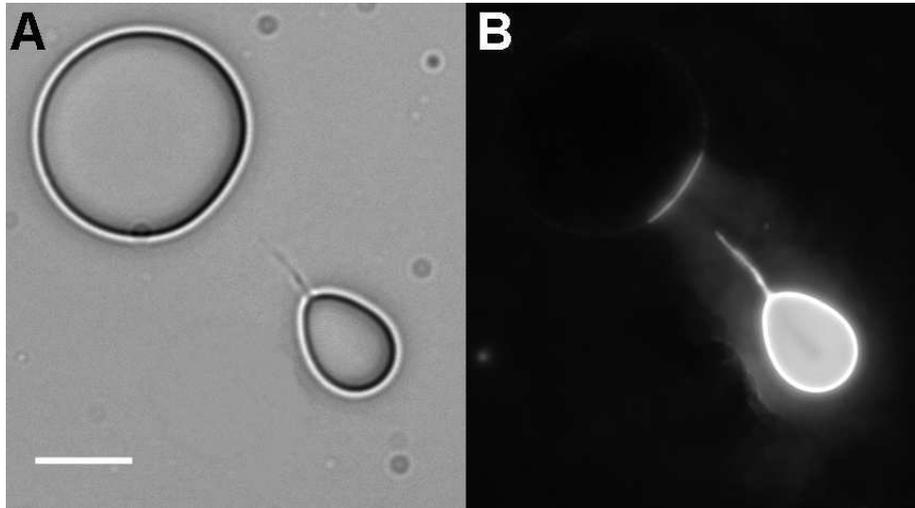


FIG. III.26: Goutte d'huile formant un tube sous l'effet de l'actine (barre $6\mu\text{m}$). A) En lumière blanche, on voit deux compartiments contenant de l'huile connectés par un mince filet d'huile. B) Même image en fluorescence : la protéine VCA (marquée FITC) apparaît en brillant sur l'image. Initialement, les deux compartiments formaient vraisemblablement une seule goutte, l'actine a tout d'abord déformé la goutte puis a fini par tirer un "tube d'huile".

L'origine physique de cette transition entre la forme en poire et la formation d'un tube d'huile n'est pas décrite par le modèle.

Pour déterminer la forme de la goutte, le modèle n'a pas besoin de connaître explicitement le module élastique du gel, son influence est cependant cachée dans la valeur de l'angle θ_0 qui caractérise la déformation de la goutte. Comme nous le verrons plus en détail au paragraphe suivant, lorsque l'on rajoute aux extraits cellulaires des protéines qui influent sur la structure du gel d'actine, on observe que cela influe sur les déformations de la goutte.

De manière plus générale, il serait intéressant de pouvoir prédire l'évolution des déformations de la goutte suivant les caractéristiques physiques du système, que se soit la taille des gouttes d'huile ou les propriétés élastiques du gel.

III.6.2 Influence de l'ajout de protéines réticulant l'actine sur la déformation

Nous avons changé les propriétés mécaniques du gel d'actine formé sur la goutte d'huile afin d'observer l'influence que cela peut avoir sur le comportement de la goutte, à savoir sa vitesse et sa déformation. Pour ce faire, nous avons ajouté de la fascine aux extraits cellulaires habituellement utilisés. Cette protéine est connue pour lier les filaments d'actine entre eux et les mettre en faisceaux (figure III.27). La question est ici : comment une modification des propriétés élastiques du gel entrainera-t-elle des modifications dans les forces impliquées et le mouvement. Nous présentons ici les résultats préliminaires des expériences que nous avons menés sur la fascine.

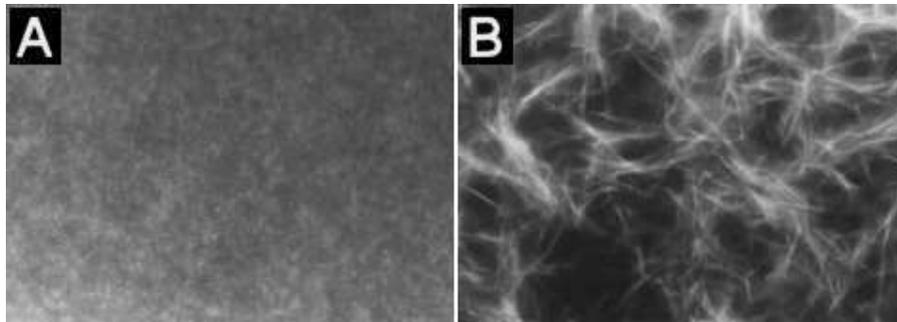


FIG. III.27: Influence de la fascine sur la structure du réseau d'actine. L'actine est marquée à la rhodamine-phalloïdine. On voit sur les images, deux solutions d'actine laissées une demi-heure à température ambiante, sur l'image (B) la solution d'actine a été complémentée avec $0.86\mu\text{M}$ de fascine, alors que dans (A) il n'y a que de l'actine [Ishikawa, 1998]

Les extraits cellulaires contiennent naturellement de la fascine mais en quantité insuffisante pour générer des faisceaux d'actine comme ceux observés sur la figure III.27 B. Nous avons donc, lors de nos expériences, ajouté $4\mu\text{L}$ de fascine à $11,8\mu\text{M}$ dans $15\mu\text{L}$ d'extraits Hela, soit une augmentation de $2,48\mu\text{M}$ de la concentration en fascine.

La première observation que l'on a faite fut de remarquer avec quelle rapidité survient la brisure de symétrie en présence de fascine. Lorsque l'on ne supplémente pas les extraits cellulaires en fascine, il faut attendre environ 1h30 pour constater la présence de gouttes avec une comète, alors qu'ici, en moins de 5 minutes, la majorité des gouttes d'huile se déplacent déjà. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente (II.3), le temps caractéristique de brisure de symétrie du gel dépend de son module élastique. Nous avons donc ici une première indication qui nous confirme que nous avons bien modifié la nature du gel formé à la surface des gouttes.

Si on regarde maintenant les déformations que l'on mesure par le rapport a/b (cf. III.5.2), on observe sur la figure III.28 comme précédemment que les gouttes les plus grosses sont les plus déformées. On voit surtout ici qu'en présence de fascine, les gouttes sont plus déformées.

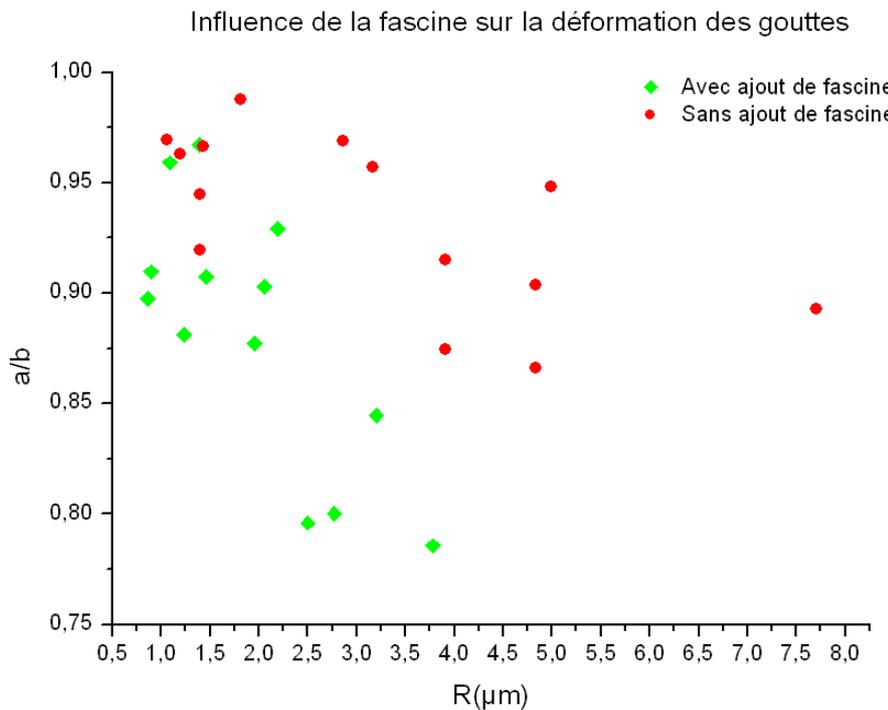


FIG. III.28: Influence de la présence de fascine sur les déformations des gouttes d'huile.

On s'intéresse maintenant à l'influence de la fascine sur les contraintes exercées par le gel d'actine sur une goutte d'huile. Pour cela, comparons deux gouttes de tailles comparables dont l'une a incubé dans des extraits cellulaires « classiques » et la seconde dans des extraits complétés en fascine. On peut constater visuellement sur la figure III.29 qu'en présence de fascine, la goutte d'huile est plus déformée.

Cette observation visuelle est confirmée par l'analyse de la répartition des contraintes exercées par l'actine le long du profil de ces deux gouttes. L'amplitude des contraintes développées par le gel d'actine est plus importante en présence de fascine (figure III.30).

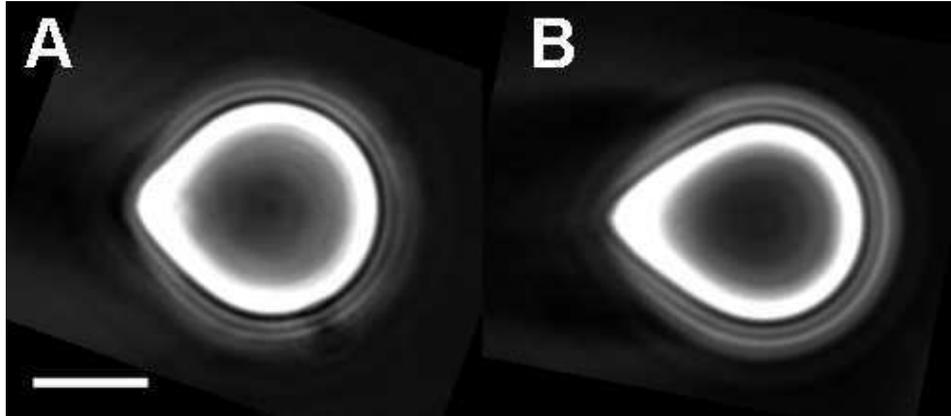


FIG. III.29: Deux gouttes de taille comparable : (A) la goutte est dans des extraits non complétés en fascine. En présence de fascine (B), la goutte est davantage déformée.

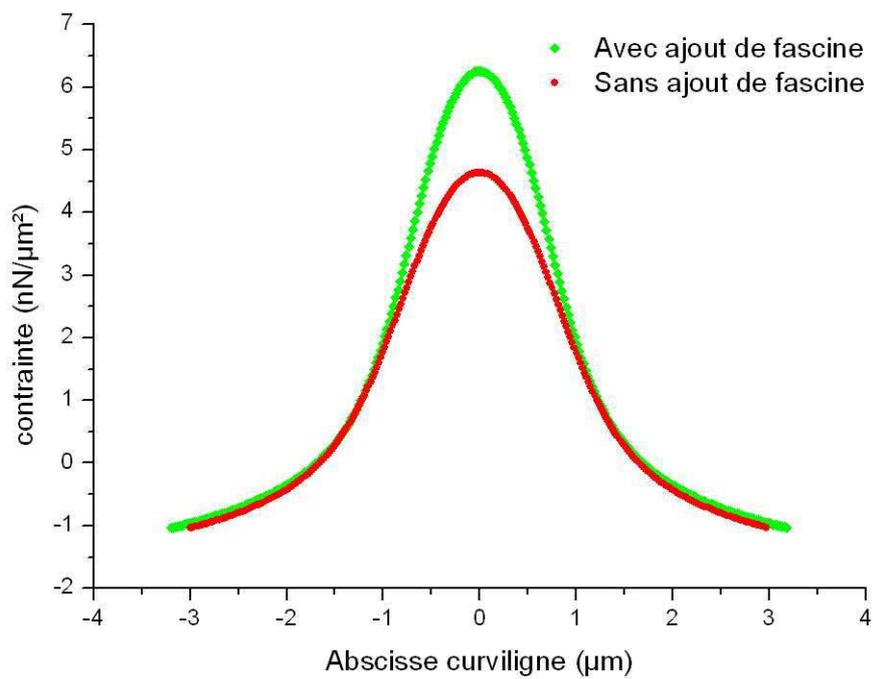


FIG. III.30: Influence de la fascine sur les contraintes produites par le gel d'actine.

III.7 Conclusion

Nous venons de voir que le système expérimental des gouttes d'huile présente l'avantage d'avoir une tension interfaciale bien caractérisée, ce qui permet de déterminer quantitativement les contraintes que peut produire un gel d'actine. De plus, les expériences que nous venons de présenter sur la fascine nous montrent que le système des gouttes est un outil suffisamment sensible aux caractéristiques élastiques du gel pour permettre de mener des études sur les influences de protéines réticulant l'actine et mesurer les contraintes que sont capables de produire les gels d'actine qui en résultent dans chaque cas.

Conclusion générale

Les réseaux d'actine dans la cellule occupent de nombreuses fonctions. Nous nous sommes intéressés à un aspect particulièrement important des réseaux d'actine qui est l'assemblage dynamique et ses conséquences sur le mouvement cellulaire et la répartition des forces de propulsion. Nous avons étudié d'une part comment un gel d'actine en train de croître en symétrie sphérique, pouvait être instable, d'autre part comment les contraintes développées par le gel d'actine pouvaient être mesurées expérimentalement et comprises de manière théorique. Cela nous a permis d'avancer dans la compréhension des modes d'action et de fonctionnement de l'actine. L'utilisation des gouttelettes d'huile développée dans la dernière partie de la thèse, se révèle être un outil puissant pour la détermination des contraintes produites par un gel d'actine. Son utilisation peut le cas échéant être étendue à tout système développant des contraintes par polymérisation. Dans notre cas, un certain nombre d'expériences restent à mener. Il serait notamment intéressant d'utiliser des gouttes de taille bien contrôlée afin d'avoir une statistique plus importante pour chaque taille de goutte, mais surtout pour déterminer avec précision pour quel rayon de goutte on observe systématiquement la formation de « tube d'huile » et quels paramètres influent sur ces mécanismes. En l'occurrence, la tension interfaciale entre l'huile et le milieu qui l'entoure, ainsi que les propriétés mécaniques du gel d'actine sont très vraisemblablement de bons candidats. Pour améliorer le système, il faudrait pouvoir, en changeant la nature de l'huile utilisée, contrôler la tension interfaciale du système. En effet, comme nous l'avons vu, dans une cellule, l'actine est arrangée de différentes manières, toutes ces structures possèdent des propriétés mécaniques qui leurs sont propres et les forces que chacun d'entre eux est capable de déployer sont très différentes. Le contrôle de la tension interfaciale du système permettrait d'avoir des gouttes adaptées à l'observation de chaque amplitude de contrainte. Une tension interfaciale plus importante permettrait d'observer les déformations causées par des gels très denses et possédant un module élastique élevé, alors qu'à l'inverse, les réseaux d'actine plus lâches requièrent des tensions interfaciales plus faibles pour pouvoir observer des déformations de la goutte. La mise au point d'un système dont on peut contrôler à souhait la tension interfa-

ciale passera certainement par l'utilisation d'un système chimique totalement artificiel plus facilement modifiable. La difficulté majeure résidera certainement dans le fait d'avoir une surface sur laquelle les protéines activant la polymérisation de l'actine veuille bien s'adsorber sans endommager la partie active de la protéine.

Article : "Soft *Listeria* : Actin based propulsion of liquid drops"

Soft *Listeria*: Actin-based propulsion of liquid dropsHakim Boukellal,¹ Otger Campás,^{1,2} Jean-François Joanny,¹ Jacques Prost,^{1,3} and Cécile Sykes¹¹*Institut Curie, UMR 168, 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05, France*²*Department d'ECM, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain*³*ESPCI, 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris Cedex 05, France*

(Received 5 May 2003; published 2 June 2004)

We study the motion of oil drops propelled by actin polymerization in cell extracts. Drops deform and acquire a pearlike shape under the action of the elastic stresses exerted by the actin comet, a tail of cross-linked actin filaments. We solve this free boundary problem and calculate the drop shape taking into account the elasticity of the actin gel and the variation of the polymerization velocity with normal stress. The pressure balance on the liquid drop imposes a zero propulsive force if gradients in surface tension or internal pressure are not taken into account. Quantitative parameters of actin polymerization are obtained by fitting theory to experiment.

DOI: 10.1103/PhysRevE.69.061906

PACS number(s): 87.15.-v, 87.10.+e, 87.14.-g

Actin polymerization is a key element in the motility of most cells and bacteria. The bacteria *Listeria monocytogenes* are propelled inside cells by the growth of a soft elastic comet made of a filamentous actin network. Actin polymerizes at the back of the advancing bacterium. The biochemistry of the comet formation is now well understood [1]. Theoretical approaches have been proposed to explain the physical mechanism of force production. They differ by the scale at which they describe the mechanism. Molecular models by Mogilner *et al.* [2] consider the Brownian flexibility of growing actin filaments, whereas Carlsson [3] concentrates on the effect of branching and growth of the actin network. Gerbal *et al.* [4] analyze at a mesoscopic scale the elastic stresses exerted by the deformed comet gel on the bacterium resulting in the propulsive force [5].

A further step in understanding the propulsion mechanism is provided by the study of biomimetic experimental systems where *Listeria* are replaced by solid spherical beads on which actin polymerization promoters [6–9] are attached. These beads mimic closely the natural propulsion mechanism of *Listeria* with comet tail formation, after the breaking of the initial spherical symmetry [6,10]. Biomimetic systems allow for a systematic variation of the parameters and thus for a quantitative comparison to theory.

The aim of this paper is to demonstrate both theoretically and experimentally the mechanism of force production due to the elastic stresses exerted by the actin comet gel. A newly designed experimental system is made of oil drops with actin polymerization promoters attached on their surface. Once placed in cell extracts, such an oil drop moves by actin polymerization and deforms under the action of the elastic stresses exerted by the gel. The same squeezing effect is observed on endosomes [11] driven by actin comets and synthetic vesicles covered with the bacterial protein ActA [12,13]. However, for liquid drops, the knowledge of the surface tension and the constant volume allow for a quantitative analysis of the observed shape and thus the determination of the elastic stress distribution on the drop surface.

An emulsion of oil drops is obtained by sonicating (5 sec, 90 W) a mixture of edible oil, Iso4, and buffer (2.3% oil in borate buffer 100 mM, pH 8.5). The actin polymerization

promoter VCA is the C-terminal domain of the Wiskott-Aldrich syndrom protein (WASP) that interacts with the Arp 2/3 complex and actin monomer, and purified as described in Fradelizi *et al.* [14]. VCA is adsorbed onto the oil drops by incubating 10 μ l of the emulsion with a 0.2 mg/ml VCA solution in borate buffer. A volume of 0.2 μ l of the emulsion coated with VCA is added to 15 μ l of HeLa extracts prepared as explained in Noireaux *et al.* [9] with a final protein concentration of 19 mg/ml. As usual the extracts are supplemented with 0.019 mg/ml G-actin, 0.06 mg/ml rhodamin actin, 1 mM ATP, 27 mM creatine phosphate, 1 mM DTT (dithio-threitol).

The sample is observed by bright field or fluorescence microscopy using an Olympus BX51 (Germany) and MetaMorph software (Princeton Instruments, USA). The drop radii range from 1.5 to 5.5 μ m. As with *Listeria*, actin polymerizes only at the interface between the drop and the comet and depolymerizes at the back of the comet. When placed in extracts, actin is first polymerized on the drops with a spherical symmetry. After roughly 1 h, symmetry is broken for approximately 70% of the drops. They develop an actin comet, deform into a pearlike shape and move. Smaller drops are less deformed than larger drops. An example of a moving drop is shown in Fig. 1. At the beginning of the experiment, the actin polymerization factor VCA is uniformly distributed around the spherical drop. After deformation of the drop and formation of the comet, fluorescence intensity measurements using FITC (fluorescein isothiocyanate)-labeled VCA [15] show that 90% of the VCA is found on the comet side of the drop, as seen in Fig. 2. This means either that VCA has been displaced from the interface to the bulk of the extract except where the gel is present, or that all VCA has been collected by the gel during the symmetry breaking process. In any event this also means that the VCA surface density is comparable to the density of filament extremities at the surface. The average distance d between filament extremities is larger than the close-packing distance. A lower bound of d is 10 nm. The surface tension change due to the presence of VCA at the interface is then of order $kT/d^2 < 4 \times 10^{-2}$ mN/m, more than 100 times smaller than the oil-extract tension that we measure by the pendant drop method $\gamma_0 = 4 \pm 0.6$ mN/m.

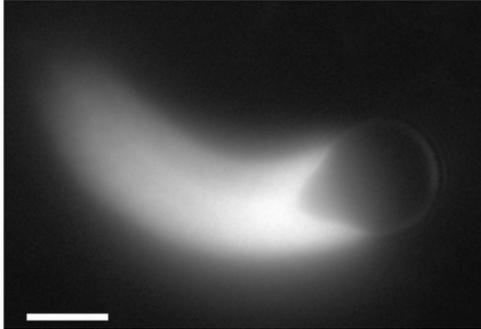


FIG. 1. Oil drop covered with VCA placed in HeLa cell extracts supplemented with Alexa-actin and observed by fluorescence microscopy. The actin comet appears bright. The bar is $4 \mu\text{m}$.

The experimental shape of the drop is sketched in Fig. 3. The front part is a spherical cap of radius R not covered by actin. The radius R is different from the radius of the undeformed spherical drop R_0 that fixes the volume $4\pi R_0^3/3$. The back part of the drop, surrounded by the comet, has a blunted conelike shape (rotationally symmetric around the direction of motion). In order to give a theoretical description of the drop shape, we parametrize it by the liquid thickness h and the local angle θ between the tangent to the shape and the direction of motion. The spherical cap and the cone match at the triple line between the drop, the comet, and the surrounding solvent; we call the tangent angle at the contact point θ_m where the corresponding oil thickness is $h_m = R \cos \theta_m$. The pressure inside the drop varies from point to point since the drop motion induces an internal flow. At the interface with the extract, in the spherical part, it is given by Laplace's law $P_{in} = 2\gamma_0/R + P_0$, where P_0 is the pressure in the surrounding liquid. At any point inside the drop, the pressure differs from P_{in} and reads $P = P_{in} + \delta P$. At a point of thickness h the local stress balance along the normal of the drop is given by the local Laplace's law

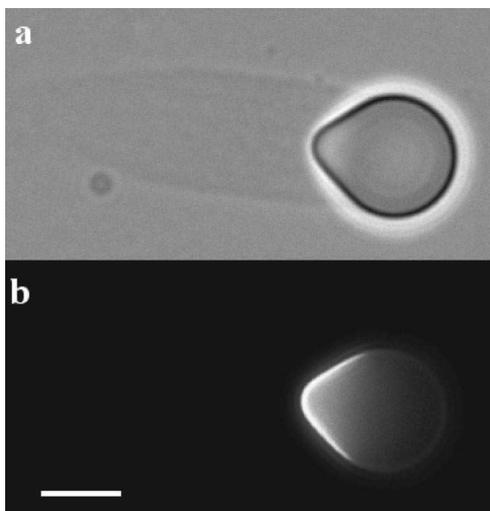


FIG. 2. Oil drop covered with FITC-labeled VCA and placed in HeLa cell extracts observed (a) by bright field microscopy and (b) by fluorescence microscopy. The VCA appears bright. The bar is $3 \mu\text{m}$.

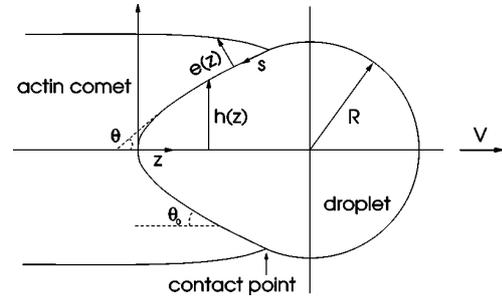


FIG. 3. Sketch of the moving oil drop. For theoretical analysis, the shape is parametrized by the local thickness h and the local angle of the tangent θ .

$$\frac{2\gamma_0}{R} + \delta P(h) = \gamma \left(\frac{\cos \theta(h)}{h} + \frac{d \cos \theta(h)}{dh} \right) - \sigma_{nn}(h) \quad (1)$$

where σ_{nn} is the normal stress at the surface of the comet, exerted by the drop (σ_{nn} is positive, dilative stress, if the comet pulls on the drop and negative, compressive stress, if the comet pushes the drop). Although we argued that the surface tension gradients are small, we consider here that the surface tension $\gamma = \gamma_0 + \delta\gamma(h)$ varies along the interface; it is constant in the spherical part with a value γ_0 and it is continuous at the contact line. The total elastic force F_e exerted by the comet on the drop is obtained by integrating the projection of the normal elastic stress on the direction of motion,

$$F_e/2\pi = \int_0^{h_m} dh h \left(\cos \theta \frac{d\delta\gamma}{dh} + \delta P \right). \quad (2)$$

If we ignore both the pressure gradient inside the drop and the surface tension gradient, the propulsive force equals zero. This result holds for any axisymmetric drop shape whatever the elastic stress distribution along the surface, independent of any model for the comet elasticity and the actin polymerization velocity. This hypothesis, used in Refs. [12,13], is unable to produce an estimate of the propulsive force. The important consequence of Eq. (2) is that an experimental measurement of the propulsive force must take into account the surface tension gradient and the flow inside the drop as discussed later.

We now proceed with the determination of the drop shape and the stress distribution. Given that the surface tension variation is small along the drop contour and neglecting hydrodynamic effects, we consider, for local equations, that the surface tension and the internal pressure are constant. The elastic stresses in the gel influence the polymerization kinetics; polymerization is normal to the surface of the drop and it is accelerated by a dilative stress and slowed down by a compressive stress. Classical rate theories [16] predict a polymerization velocity v_p varying as a Boltzmann law

$$v_p(h) = v_p^0 \exp[\sigma_{nn}(h)/\sigma_0], \quad \sigma_0 \equiv kT/a^2\delta \quad (3)$$

where a is the distance between actin polymerization promoters on the drop surface, δ is of the order of the size of an actin monomer, and v_p^0 is the polymerization velocity in the absence of stress.

The last equation determining the shape of the drop is the conservation of the gel volume upon polymerization. In a first approximation, we assume both that the gel density is constant and that the comet is a perfect cylinder. In a steady state, the drop advances at a constant velocity V . The local gel thickness e shown on Fig. 3 is then such that $de/ds = \tan \theta$ where s is the length along the drop contour. With these simplifying approximations, the local polymerization velocity is related to the advancing velocity by $v_p(h) = V \sin \theta(h)$.

This approximation does not allow for the determination of the drop velocity V since the propulsive force vanishes. We thus find a family of solutions for the drop shape parametrized by the advancing velocity. We determine the drop shape using the measured advancing velocity $V = 0.15 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$.

The shape of the comet-drop interface departs from a pure cone when the Boltzmann factor is significantly larger than 1. This defines the size of the blunted region as $\ell \equiv \gamma a^2 \delta / kT$ which leads to $\sigma_0 = \gamma / \ell$. In the following we consider $\varepsilon \equiv \ell / R$ as a small number.

For h of order R , the elastic stress $\sigma_{nn}(h)$ is small and can be neglected. Then Eq. (3) describes a perfect cone with angle $\theta = \theta_0$ such that $V \sin \theta_0 = v_p^0$. This result is independent of the polymerization law giving v_p as a function of $\sigma_{nn}(h)$. The measure of θ_0 thus gives access to the polymerization velocity in the absence of elastic stress.

In the blunted region, h is of order ℓ and we neglect the Laplace pressure term on the left-hand side of Eq. (1). In the vicinity of the rear point, the drop profile is given by $h^2 = 4\ell z / \log(1/\sin \theta_0)$.

The normal stress in the rear region of size ℓ is positive and of order γ/ℓ . At the rear point, $\sigma_{nn}(h=0) = \gamma \log(1/\sin \theta_0) / \ell$. In the conical region, the stress reads at lowest order in ε

$$\sigma_{nn}(h) = (\gamma/R)(-2 + R \cos \theta_0/h). \quad (4)$$

It is positive at the back of the drop (pulling the drop backwards) and negative in the front part of the cone (pushing the drop forwards) as qualitatively observed in Ref. [12]. It vanishes for a thickness $h = (R \cos \theta_0)/2 = h_m/2$. This is in accordance with the prediction made in Ref. [4] that the actin gel could pull at the rear of *Listeria* and explains the pearlike deformation that we now describe quantitatively.

A more detailed description of the drop profile is obtained by solving numerically Eqs. (1) and (3). We use the radius R as a unit length; the drop profile depends on the two dimensionless parameters, ε and $\sin \theta_0 = v_p^0/V$. In Fig. 4 we show a comparison of the calculated and experimental profiles for the drop of Fig. 1. The experimental profile has been digitized and adjusted by a continuous curve. The best fitting parameters are $\varepsilon = 0.049$ and $\sin \theta_0 = 0.58$ ($\theta_0 = 35.6^\circ$); this gives a determination of the length $\ell = 0.125 \mu\text{m}$, of the stress $\sigma_0 = 32 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$, and of the polymerization speed in the absence of stress $v_p^0 = 1.4 \text{ nm}/\text{s}$ [17]. The local normal stress is obtained from the experimental drop shape by using Eq. (1) with a constant interfacial tension γ_0 and neglecting

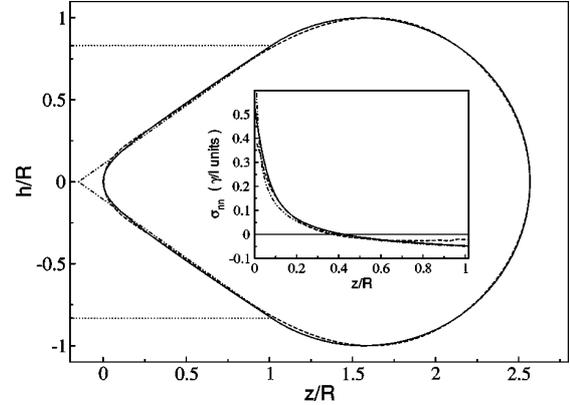


FIG. 4. Calculated drop profile for $\varepsilon=0.049$ and $\sin \theta_0=0.58$ (continuous line) compared to the experimental drop profile (dashed line) and to the zeroth order asymptotic expansion (dash-dotted line). The inset shows the normal stress distribution along the drop surface.

the variation of the internal pressure δP . The length ℓ being constant, smaller drops corresponding to larger ε are less deformed, in agreement with experiments.

In the description proposed so far, the curvature of the interface between the comet and the drop has a discontinuity at the triple line. In the spherical region, the curvature of the interface is $2/R$; in the conical region, the interface is curved only in one direction and the curvature is $1/R$. The local forces normal to the interface are still balanced and the elastic normal stress in the comet at the triple line is $\sigma_{nn}(h_m) = -\gamma/R$ (see the inset of Fig. 4). At the triple line, the gel thickness e vanishes and cannot create a finite stress. This explains why on Fig. 4 the theoretical and experimental normal stresses are in disagreement in the very vicinity of the triple line. We now assume that the gel density remains constant but that the comet shape is not a perfect cylinder in the region close to the triple line. Volume conservation then imposes a polymerization velocity $v_p = V \cos \theta de/ds$, where s is the length along the interface. When a gel element is created in a time δt , it is stretched by an amount $\delta u = \delta t(-V \sin \theta + v_p)$; the tensile stresses σ_{ii} in the azimuthal direction ($i = \varphi$) and in the tangential direction along the interface ($i = t$) are then increased. At the level of scaling laws, we write this increase as $d\sigma_{ii}/ds = (E/R_i V \cos \theta)(V \sin \theta - v_p)$, where R_i is the radius of curvature of the interface in the direction i and E an elastic modulus of the comet. In the vicinity of the triple line, we use the thin shell approximation and relate the tensile and normal stresses in the gel $\sigma_{nn} = -e[(\sigma_{tt}/R_t) + (\sigma_{\varphi\varphi}/R_\varphi)]$. In this boundary layer, the two tensile stresses can be considered as constant; the matching to the pearlike shape imposes that the azimuthal tensile stress $\sigma_{\varphi\varphi}$ vanishes. Defining the dimensionless tensile stress $\tilde{\sigma}_t = \ell \sigma_{tt} / \gamma$, the normal stress in the boundary layer is then calculated as

$$\sigma_{nn} = -\frac{\gamma}{R\ell + e} \frac{e\tilde{\sigma}_t}{\tilde{\sigma}_t}. \quad (5)$$

As the thickness of the gel vanishes, the normal stress vanishes as expected. The boundary layer, where the comet is

deformed, has a thickness $\ell/\bar{\sigma}_t$ of order ℓ and is thus small in the limit where ε is small. When e is large, further away from the triple line, the comet reaches a cylindrical shape and the normal stress is $-\gamma/R$; one can consider the comet as a perfect cylinder as done above.

Our experimental observations on the shape of liquid drops propelled by actin polymerization are well described by the theoretical model based on a local normal force balance and on a Boltzmann variation of the polymerization velocity with normal stress. The results are robust if we use, for the polymerization velocity, the mathematical forms suggested by simulations on flat surfaces [3]. We demonstrate that the elastic propulsive force cannot be calculated from an elastic stress distribution that ignores both pressure variations inside the drop and surface tension gradients. We have estimated the surface tension gradient by assuming that the actin polymerization promoter density profile along the interface follows the gel elastic deformation. This leads to a propulsive force of order $F_e \sim 2\pi\gamma_0\varepsilon_G/E$, where ε_G is the Gibbs elastic modulus of the interface. With reasonable values of the parameters, we find a propulsive force of order 100 pN. This is, however, a lower bound since there could exist other contributions to the surface tension gradient. The advancing velocity of the drop results from a balance between the propulsive force and the friction force between the comet and

the drop but a precise study of the velocity selection will require a more refined analysis.

In our experiments, as well as in Ref. [12], the motion stops when the drop (or the liposome) becomes spherical. The large stress at the back of the drop could lead to “cavitation” or rupture of the links between the drop and the comet. The elastic stresses exerted on the drop then relax and provoke the experimentally observed arrest. We expect the stress distribution to be similar for other types of actin propelled objects such as the bacteria *Listeria* or solid beads. This would explain the observation of hollow comets of *Listeria* [10]. A final output of our analysis is an estimate of the polymerization velocity of an actin gel in the absence of stress and its variation with stress.

ACKNOWLEDGMENTS

J.F.J. is grateful to A. van Oudenaarden for sending a copy of Ref. [12]. O.C. thanks the European Network PHYNECS (HPRN-CT-2006-00312) and Ministerio de Educación, Cultura y Deporte for financial support. We thank J. Casademunt and K. Zeldovitch (Institut Curie) for help in the numerical work and V. Noireaux for initiating the experiments.

-
- [1] T. Pollard, L. Blanchoin, and R. Mullins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545 (2000).
- [2] A. Mogilner and G. Oster, *Biophys. J.* **71**, 3030 (1996); **84**, 1591 (2003).
- [3] A.E. Carlsson, *Biophys. J.* **81**, 1907 (2001).
- [4] F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin, and J. Prost, *Biophys. J.* **79**, 2259 (2000).
- [5] J. Prost, *The Physics of Listeria Motion in Physics of Biomolecules and Cells*, edited by H. Flyvberg, F.J. Licher, P. Ormos, and F. David, *Les Houches Lecture Notes LXXV*, (Springer, Berlin), 2002.
- [6] A. Bernheim-Groswasser, S. Wiesner, R. Golsteyn, M. Carlier, and C. Sykes, *Nature (London)* **417**, 308 (2002).
- [7] L. Cameron, M. Footer, A. van Oudenaarden, and J. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4908 (2000).
- [8] D. Yazar, W. To, A. Abo, and M. Welch, *Curr. Biol.* **9**, 555 (1999).
- [9] V. Noireaux, R.M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes, *Biophys. J.* **78**, 1643 (2000).
- [10] A. van Oudenaarden and J. Theriot, *Nat. Cell Biol.* **1**, 493 (1999).
- [11] J. Taunton, B. Rowning, M. Coughlin, M. Wu, R. Moon, T. Mitchison, and C. Larabell, *J. Cell Biol.* **148**, 519 (2000).
- [12] A. Upadhyaya, J. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani, and A. van Oudenaarden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4521 (2003).
- [13] P.A. Giardini, D.A. Fletcher, and J.A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6493 (2003).
- [14] J. Fradelizi, V. Noireaux, J. Plastino, B. Menichi, D. Louvard, C. Sykes, R. Golsteyn, and E. Friederich, *Nat. Cell Biol.* **3**, 699 (2001).
- [15] For FITC (fluorescein isothiocyanate) labeling, VCA is incubated for 1 h with 0.08 mg/ml of FITC (in 100 mM borate buffer, pH 8.5) and dialysed against PBS at 4 C.
- [16] H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **3**, 107 (1935); H. A. Kramers, *Physica (Utrecht)* **7**, 284 (1940).
- [17] Series of measurements in a given preparation of cell extract show a dispersion both in ℓ and v_p^0 of order $\pm 20\%$. A much larger spread of several hundred percent is found between different preparations (leading to different total protein concentrations).

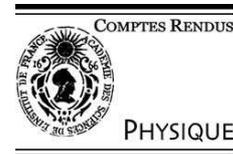
Article : "Propelling soft objects"



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

C. R. Physique 4 (2003) 275–280



Hydrodynamics and physics of soft objects/Hydrodynamique et physique des objets mous

Propelling soft objects

Objets mous actifs

Hakim Boukellal, Julie Plastino, Vincent Noireaux¹, Cécile Sykes*

Laboratoire physico-chimie Curie, UMR 168 CNRS/Institut Curie, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

Presented by Guy Laval

Abstract

Cells move by the action of specific proteins or small molecules that assemble and interact, constituting a dynamic network called the cytoskeleton. Actin, one of the major components of eucaryotic cells, exists as filaments (semi-flexible polymers) or as monomers. Local assembly of the actin network leads to cell movement as well as to the propulsion of objects like bacteria or liposomes within cells. In order to understand the force generated for this propulsion, we use biomimetic experimental systems that allow for the control of physical parameters. We show evidence for the role of elasticity in the propulsion mechanism. **To cite this article: H. Boukellal et al., C. R. Physique 4 (2003).**

© 2003 Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Résumé

Une cellule se déplace par l'action de protéines spécifiques ou de petites molécules qui s'assemblent et interagissent, formant un réseau dynamique, le cytosquelette. L'actine est un des constituants majeurs des cellules eucaryotes et existe sous forme de monomères ou de filaments (polymères semi-flexibles). L'assemblage local du réseau d'actine assure le mouvement de la cellule et également la propulsion d'objets comme des bactéries et des liposomes. Pour comprendre l'origine de la force nécessaire à cette propulsion nous concevons des systèmes expérimentaux biomimétiques permettant une variabilité des paramètres physiques. L'élasticité du réseau dynamique a une importance majeure dans le processus du mouvement. **Pour citer cet article : H. Boukellal et al., C. R. Physique 4 (2003).**

© 2003 Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Keywords: Actin; Polymerisation; Motility; Deformation; Elasticity; Droplet

Mots-clés : Actine ; Polymérisation ; Motilité ; Déformation ; Élasticité ; Goutte

1. Introduction

Actin assembly inside the cell is responsible for the deformation of the plasma membrane and cell movement. Actin filaments are asymmetric polymers with their growing (or barbed) ends oriented towards the cell membrane. Filaments depolymerise from the pointed ends which are oriented towards the cell body, and diffusion of released monomers back to the barbed ends permits the recycling of actin monomers for polymerisation. Other objects, like the bacterium *Listeria monocytogenes* [1] or

* Corresponding author.

E-mail address: cecile.sykes@curie.fr (C. Sykes).

¹ Present address: The Rockefeller University, Center for Studies in Physics, Libchaber Lab, Box 265, 1230 York Avenue, New York, NY 10021, USA.

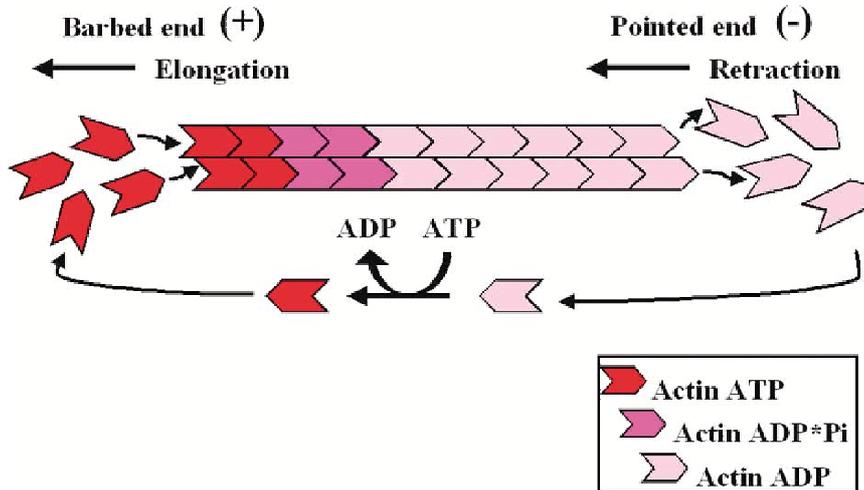


Fig. 1. Principle of growth and retraction of an actin filament in the presence of monomers and ATP (adenosine triphosphate).

liposomes [2], use the same mechanism for their propulsion inside cells and therefore constitute model systems for studying actin-based motility.

More precisely, there are several different species of pathogenic bacteria (*Listeria*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia rickettsii*) and the Vaccinia virus that move within cells by actin assembly [3]. The size of these pathogens is on the order of one micrometer. Movement produced by actin polymerisation is on the order of a few micrometers per minute, and the velocity can vary depending on the cell type [4–6]. Vesicles called pinosomes [7] use the same mechanism of actin polymerisation for moving from the cell membrane to the cytosol. Endosomes and lysosomes [2] in *Xenopus* egg cells and extracts also undergo actin-based movement. All of these objects are propelled by generating ‘comet tails’ that are composed of actin filaments assembled at their surface. In order to study this phenomenon, extensive *in vitro* work has been done in cell extracts on the pathogen motility systems, especially *Listeria*. Recently, *Listeria* and *Shigella* motility was successfully reproduced in a mixture of purified proteins, greatly enhancing our understanding of the minimum biochemical requirements for motility [8].

At the steady-state, actin filaments exist at a constant length where actin polymerisation at one end is balanced by depolymerisation from the other end. The source of energy for this process is adenosine triphosphate (ATP). Fig. 1 shows the principle of actin filament ‘treadmilling’. Localised actin assembly is produced by the recruitment of actin polymerisation nucleating proteins to the sites of movement, creating filaments barbed ends at these sites. In the case of *Listeria*, the nucleator of actin polymerisation is the complex ARP2/3 [9], which is present in the cytosol and activated by the bacterial membrane protein called ActA [10]. The ARP2/3 complex is also an actin filament branching factor. In eucaryotic cells, the WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) family proteins are present at the plasma membrane and activate the ARP2/3 complex to lead to local actin polymerisation.

Due to the presence of actin filament cross-linking proteins in cells, actin networks act as gels whose elastic properties are of great importance in producing propulsion [11]. To further investigate this elastic effect and other physical properties of actin-based movement, we use biomimetic experimental systems that allow us to overcome the limitations imposed by living things like *Listeria*. With our system, it is possible to vary the size of the object, its deformability, and the surface concentration of actin polymerisation nucleators. In this paper, we will summarise the work that led to an understanding of the physical properties of actin gels growing from a surface. We will also show new direct evidence for the elastic properties of actin gels and the consequences of elasticity when propelling soft objects.

2. Model systems for propelled objects inside cells

Movement induced by polymerisation is an unknown phenomenon in physical chemistry, although the principle is simple: inserting material between two objects can lead to a displacement. From a physical point of view, there are several key questions. What is the mechanism that generates force and displacement? How can we predict the velocity of objects moving by actin polymerisation? What are the physical parameters that control the movement?

Many theoretical physical approaches have attempted to explain the movement induced by actin polymerisation. One is a rectified Brownian motion (or thermal ratchet) model [12] that supposes no attachment between the bacterium and the comet. This model has been contradicted by two experiments: in one of them [13], bacteria moving in *Xenopus* egg extracts are trapped in optical tweezers and cannot move independently from their comet, showing that bacteria are attached to their comet; in the other [14], bacteria move at the same speed in mouse fibroblast cells of different viscosity, showing that bacterial speed is independent of its Brownian motion. A model based on the Brownian motion of actin filaments [15] was derived later, and predicts no dependence of the bacterial velocity on its size, in contradiction with recent experiments [16] where beads of different radii (from 1 to 10 μm), placed in a mixture of purified proteins, move slower when the radius increases. A different theoretical approach is an elastic analysis [11] of the gel generated at the surface of the bacterium. The prediction is that the stresses on the bacterial surface and the friction exerted by the actin gel on the bacterium can lead to different regimes of motility, from ‘saltatory’ (or jerky) to continuous motion, explaining a phenomenon that has been observed in genetically modified *Listeria* moving in *Xenopus* egg extracts [17].

The need for experimental data to test these models encouraged the design of new systems where more parameters could be changed. Polystyrene beads coated with the recombinant protein ActA and placed in human cell extracts (HeLa cells) do not generate a comet, but instead develop a spherical actin gel whose thickness depends on the size of the beads [6]. Beads coated with ActA purified from *Listeria* and placed in *Xenopus* egg extracts mimic the movement of *Listeria* [18]. In these experiments, comets are formed when beads are small (less than 1 μm diameter) because symmetry breaks spontaneously, or when they are asymmetrically coated. Beads coated with VCA (a fragment of WASP) placed in HeLa cell extracts, can move by generating a comet tail made of a network of actin filaments [19]. Since this system contains no bacterial components, it provides a simplified experimental set-up for studying both the physical and the biochemical parameters of eucaryotic actin polymerisation and motility. This bead system can be used for structural characterisation of the actin gel, as shown in Fig. 2 where asymmetric beads of 500 nm diameter are observed by electron microscopy. The cross-linked structure of the gel is clear in the image of this sample, which was prepared by critical point drying and platinum shadowing. Other studies have shown a similar branched actin network in the lamellipodium of eucaryotic cells [20]. However, experiments in extracts are not appropriate for complete physical studies because only small beads (<1 μm) develop a comet, and the number of moving beads of 1 μm diameter is still low. The reasons for this are not clear but may be due to other proteins present in the extracts that prevent symmetry breaking and comet formation by strengthening the actin gel. In fact, experiments performed in a buffer containing just the proteins essential for motility show no limitation in comet formation. This motility medium [8] is an interesting alternative to cell extracts for actin-based motility studies since all the beads, ranging from 0.5 to 10 μm move in these reconstituted extracts. Using this system, we observe a wide range of behaviours depending on the size of the beads and the surface concentration of nucleators [16], allowing an investigation of the forces involved in actin-based movement. Friction at the gel/bead surface opposes the propulsion force as already analysed [11], therefore bead size and concentration of nucleators offer a direct way of changing the magnitude of each effect. Small beads move at a constant velocity of a few $\mu\text{m}/\text{minute}$. 10 μm diameter beads

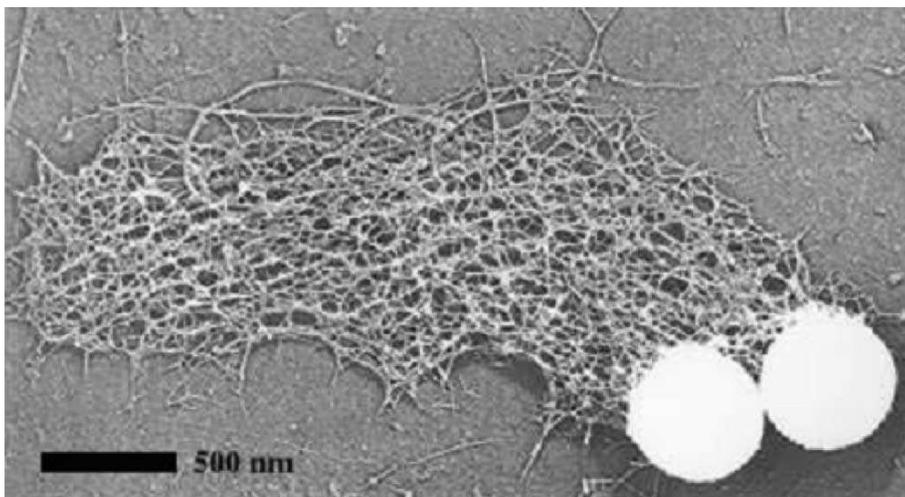


Fig. 2. Beads asymmetrically coated with a fragment of WASP that interacts with ARP2/3 and placed in HeLa cell extracts. Critical point drying and platinum replica observed by electron microscopy (collaboration with G. Resch and J.V. Small, Austrian Academy of Sciences).

move slower, but reproduce the saltatory motion previously observed with a genetically modified *Listeria* expressing a mutant ActA protein [17]. By simply changing the physical parameters of the system, we can mimic a behaviour produced by a mutant protein, showing for the first time the important effect of non-biochemistry components on actin-based motility.

3. Growing actin gels on hard spherical surfaces

Although the polymer networks of actin gels produced in solution have been extensively studied [21], surface grown actin gels are less well-characterised. One of the important physical parameters estimated for *Listeria* comet is the elastic modulus of the actin gel (10^3 to 10^4 Pa) measured by microsurgery on actin comets [13]. In spherical geometry, gels produced from surfaces are under a stress induced by the geometry because the insertion of a new monomer between the surface and the gel needs to deform and stretch the existing actin gel [6]. Because the stress is larger as the radius of curvature is smaller, the thickness of actin gels grown from polystyrene beads depends on the size of the bead. Two examples are shown in Fig. 3. Fig. 3(a) shows electron micrographs of thin sections of ActA coated beads. In Fig. 3(b), the same experiment was done with a fragment of ActA, called PRO, that does not interact with the ARP2/3 complex. We see in this figure that the thickness of the actin layer increases with the size of the bead, and a more careful analysis shows that the thickness of the actin gel is proportional to the radius of the bead for small beads (less than $5 \mu\text{m}$ diameter). For larger beads, the thickness of the actin gel is constant ($1 \mu\text{m}$ for ActA coated beads) because actin monomer diffusion limits the gel growth, an effect predicted but not observed in [6]. Analysis of the data leads to an estimation of the diffusion coefficient of actin monomers which is $2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ [22], 10 times smaller than the value measured in buffer.

4. Deformation of soft objects by actin gel growth

In order to directly observe the pressure exerted by the actin comet tail, we use soft deformable beads instead of hard polystyrene spheres. Droplets of oil (ISIO4) are coated with the VCA fragment of WASP and placed in HeLa cell extracts. After 20 minutes incubation, a comet is formed on one side of the droplet which affects its curvature, transforming the round

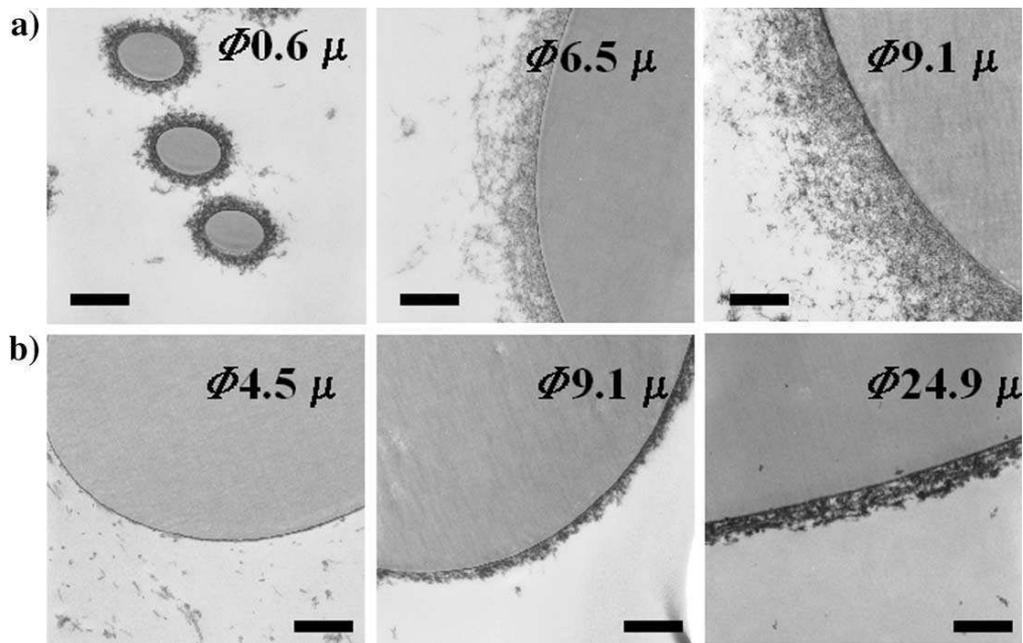


Fig. 3. Beads of various diameters coated with (a) ActA or (b) a fragment of ActA (PRO) and placed in HeLa cell extracts. Electron microscopy observation of thin sections. Bead diameter is indicated by the ϕ value on each image. Both protein-coated beads assemble actin at their surface when placed in cell extracts. The PRO-coated bead experiment is an example of an ARP2/3-independent polymerisation activity, as already shown in [24]. Bar, 500 nm.

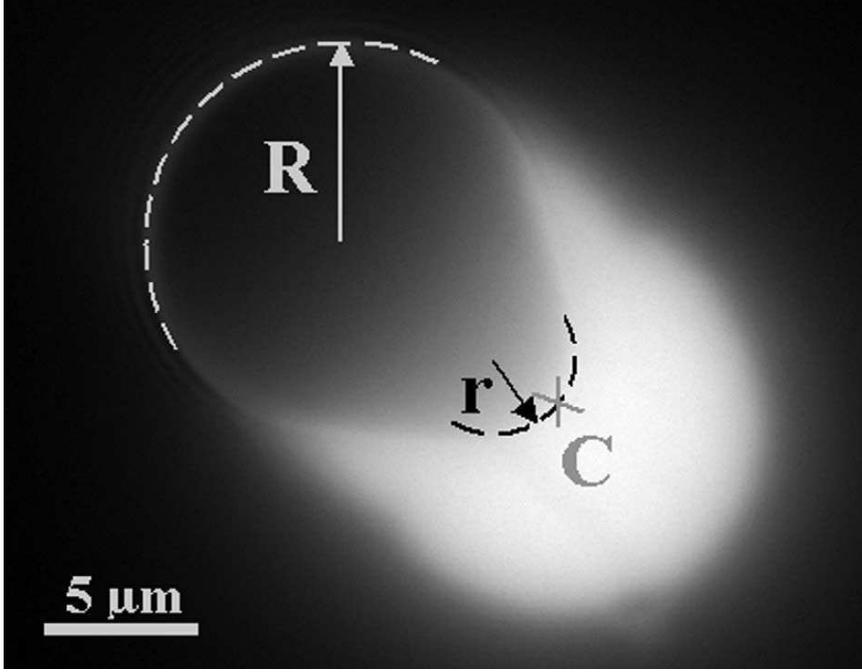


Fig. 4. Droplet of oil coated with VCA (fragment of WASP) and placed in HeLa cell extracts. Actin is marked with rhodamine.

bead into a pear shape (Fig. 4). This deformation is also observed by electron microscopy in the case of endosomes and lysosomes propelled by actin comets [2]. This effect can be explained by the stress exerted by the gel on the soft substrate. We take $\sigma_{\perp\perp}(M)$ as the normal stress exerted on the surface at point M . With $\rho(M)$ and $\rho'(M)$ as the radii of curvature at any point M on the droplet surface, the Laplace equation gives:

$$\gamma_M \left(\frac{1}{\rho(M)} + \frac{1}{\rho'(M)} \right) + \sigma_{\perp\perp}(M) = (P_{\text{int}}(M) - P_{\text{ext}}(M)), \quad (1)$$

where γ_M is the local surface tension at M , and $P_{\text{int}}(M)$ and $P_{\text{ext}}(M)$ are the hydrostatic pressures on the inside and the outside the droplet, respectively. We assume a constant surface tension $\gamma_M = \gamma$ for any point M situated at the oil/VCA/extracts interface. P_{int} is constant inside the droplet and P_{ext} is constant outside the droplet. If R is the radius of curvature at the face of the droplet free of gel (see Fig. 4), Eq. (1) applied to the extreme point of that side leads to an expression for $P_{\text{int}} - P_{\text{ext}}$ as a function of the geometry of the droplet:

$$\frac{2\gamma}{R} = P_{\text{int}} - P_{\text{ext}}. \quad (2)$$

Taking r as the radius of curvature at the extreme point C of the droplet-comet side (see Fig. 4), and writing Eq. (1) at point C with the use of Eq. (2), we find Eq. (3) where $\sigma_{\perp\perp}^C$ is the normal stress applied at C by the actin comet:

$$2\gamma \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R} \right) = -\sigma_{\perp\perp}^C. \quad (3)$$

Since the left-hand side of Eq. (3) is positive ($r < R$), $\sigma_{\perp\perp}^C$ is negative. This means that the droplet of oil is aspirated by the actin comet. The value of this negative pressure increases to reach a positive value at a lateral point of the droplet.

An estimate of the force generated by the actin comet tail can be made by considering that the pressure exerted on the deformed part of the droplet is on the order of $(-\sigma_{\perp\perp})$ on the hemisphere of radius r . Measurements of the droplet radii of curvature gives $r = 2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ and $R = 6.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$. γ can be measured using the pendant drop method [23], and is estimated at $5 \pm 1 \text{ mN/m}$ at the oil/water interface with the protein adsorbed. From Eq. (3) we deduce a value of $2550 \pm 30 \text{ Nm}^{-2}$ for the normal stress $(-\sigma_{\perp\perp})$. This leads to a total force of $100 \pm 30 \text{ nN}$ exerted by the actin comet on the bead. This estimate could explain why *Listeria* escape from optical tweezers [13] that only exert a maximal force of about 100 pN. Unlike *Listeria*, the surface is fluid in these experiments, and the actin polymerisation activator can migrate on the surface. Fluorescent labeling

of VCA shows a higher concentration at the side of the droplet where the actin comet is building. Since the surface tension decreases as the number of adsorbed molecules increases, this effect should lower the estimation made above, although other proteins from the cell extracts may counterbalance this effect by also adsorbing.

5. Conclusions

Experimental model systems that mimic biological behaviours are of great interest for understanding the physical mechanism of movement induced by actin polymerisation. In our work, we have shown by different approaches the effect of elasticity, monomer diffusion, friction and depolymerisation on the propulsion mechanism. Since depolymerisation replenishes the pool of actin monomers to be used for polymerisation, it can be a limiting factor for movement in biological systems. However, if a flow of monomers can be injected into the system, there might be no need for depolymerisation during the movement, if the system is already asymmetric. A chemical system designed with macromolecules could be of interest in testing this assumption.

Acknowledgements

We thank Ken Sekimoto and Jacques Prost for critical readings and many fruitful discussions, and Xavier Noblin for the loan of the pendant drop bench.

References

- [1] J.A. Theriot, T.J. Mitchison, L.G. Tilney, D.A. Portnoy, *Nature* 357 (1992) 257.
- [2] J. Taunton, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 85.
- [3] L.G. Tilney, P.S. Connelly, D.A. Portnoy, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2979.
- [4] V. Laurent, M.-F. Carlier, in: J. Celis (Ed.), *Cell Biology: A Laboratory Manual*, Vol. 2, Academic Press, Toronto, 1998.
- [5] J.A. Theriot, D.C. Fung, Use of *Xenopus* egg extracts for studies of actin-based motility, in: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Vol. 2, 2nd edition, Academic Press, 1998.
- [6] V. Noireaux, et al., *Biophys. J.* 278 (2000) 1643.
- [7] C.J. Merrifield, et al., *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 72.
- [8] T.P. Loisel, R. Boujemaa, D. Pantaloni, M.F. Carlier, *Nature* 401 (1999) 613.
- [9] R.C. May, et al., *Curr. Biol.* 9 (1999) 759.
- [10] S. Pistor, T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, J. Wehland, *EMBO J.* 13 (1994) 758.
- [11] F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin, J. Prost, *Biophys. J.* 79 (2000) 2259.
- [12] C.S. Peskin, G.M. Odell, G.F. Oster, *Biophys. J.* 65 (1993) 316.
- [13] F. Gerbal, et al., *Eur. Biophys. J.* 29 (2000) 134.
- [14] P.A. Giardini, J.A. Theriot, *Biophys. J.* 81 (2001) 3193.
- [15] A. Mogilner, G. Oster, *Biophys. J.* 71 (1996) 3030.
- [16] A. Bernheim-Groswasser, S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.-F. Carlier, C. Sykes, *Nature* 417 (2002) 308.
- [17] I. Lasa, et al., *EMBO J.* 16 (1997) 1531.
- [18] L.A. Cameron, M.J. Footer, A. Van Oudenaarden, J.A. Theriot, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 4908.
- [19] Our results, unpublished.
- [20] T.M. Svitkina, G.C. Borisy, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 1009.
- [21] D. Boal, *Mechanics of the Cell*, Cambridge University Press, 2000.
- [22] J. Plastino, I. Lelidis, J. Prost, C. Sykes, *Biophys. J.* (2002), submitted.
- [23] W.A. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th edition, Wiley, 1990.
- [24] J. Fradelizi, et al., *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 699.

Annexes

PREPARATION ET PURIFICATION DE PROTEINES (GST, WA, VCA)

Premier jour

I/ PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE (LB MEDIA)

Composant	Quantité
Bactotriptone	20 g
Bacto yeast extract	10 g
NaCl	20 g
NaOH (1M)	1 mL
Total de la préparation	2 L
100 mg/mL Ampicilline	2 mL

II/ STERILISATION DU LB MEDIA ET DES CONES

Pour stériliser le LB Media ou les cônes, on utilise l'autoclave au 3^{ème} étage (lire le manuel d'utilisation de l'autoclave avant votre première utilisation).

Dans notre cas on prépare souvent 2 Litres de LB Media que l'on prépare dans un bêcher. Remuer avec un barreau aimanté jusqu'à dissolution complète des poudres .

Comme par la suite on fera pousser les bactéries dans des erlenmeyers, on va dès maintenant prendre 4 erlenmeyers de 2 Litres et mettre 500 mL de LB Media dans chacun d'entre eux (mesurer avec une éprouvette). Refermer le haut des erlenmeyers en utilisant du papier aluminium, coller un bout de scotch thermosensible sur le papier aluminium (cela permet de s'assurer que la stérilisation c'est bien passée). On met les erlenmeyers dans l'autoclave pour la stérilisation : 20 minutes à 120°C (entre le préchauffage, le cycle et la dépressurisation ça prend bien 1h10).

Attention : quand on stérilise un liquide, lorsque le cycle de l'autoclave est terminé, ne surtout pas ouvrir la vanne pour évacuer la vapeur car le liquide que l'on a stérilisé s'évaporerait par la même occasion. Laisser baisser la pression et la température naturellement.

III/ FAIRE POUSSER LES CELLULES (BACTERIES) QUI SERVIRONT A PRODUIRE LA PROTEINE (petite culture)

Dans un premier temps on va « réveiller » les bactéries qui sont au -80°C

On prépare une petite quantité de bactéries qui serviront demain à préparer une grosse quantité de bactéries.

Mélange:

5 mL de LB MEDIA (stérile) + 5 µL Ampicilline (100 mg/mL) dans un tube de culture **stérile**.

On ajoute une très petite quantité de bactéries souches. On gratte à l'aide du cône stérile d'une pipette de 200µL (essuyé avec de l'éthanol) le tube contenant les bactéries encore congelées. On en tire une très petite quantité que l'on va ajouter au mélange précédant. On laisse incuber le tube dans l'incubateur à 37°C sous agitation (≈ 230-250 tours/min) pendant toute la nuit.

IV/ PREPARER LES CHOSES POUR LE LENDEMAIN

1) Assurer qu'il y a assez de l'Ampicilline et de l'IPTG (-20°C, 2 ml chacun).

IPTG 1M : prendre une bouteille de 1 g de l'IPTG (MW 238,3)—stocké à -20°C

Réchauffer entre les mains

Ajouter 4,196 mL H₂O milli-Q ; remuer bien jusqu'à la dissolution complète

Filtrer pour stériliser avec une seringue et un filtre-disc 0,22 µm ; livrer directement dans les tubes stériles de 1,5 mL, 1 mL chacun (4 x 1 mL)

Stocker à -20°C

Ampicilline 100 mg/ml : Ampicilline (MW 371,4 ; stocké à 4°C)

Prendre 800 mg de poudre ; dissoudre dans 8 mL H₂O milli-Q

Filtrer pour stériliser avec une seringue et un filtre-disc 0,22 µm ; livrer directement dans les tubes stériles de 1,5 mL, 1 mL chacun (8 x 1 mL)

Stocker à -20°C

Deuxième jour

I/ FAIRE POUSSER LES BACTERIES

On regarde dans un premier temps si la petite culture de la veille a bien marché. Si le liquide est trouble c'est que les bactéries se sont bien développées.

On peut maintenant passer à l'étape de la culture des bactéries en plus grande quantité :

- On prend les 4 erlenmeyers contenant chacun 500mL de LB Media.
- On inocule à chacun 500 μ L d'Ampicilline + 1 mL de la petite culture de bactéries préparées la veille

Attention : Toute cette procédure doit se faire de façon stérile, pour se faire on travaille près de la flamme d'un bec benzène, et avec les cônes stériles

- On met les 4 erlenmeyer à incuber à 37°C sous agitation 230-250 tours/min
- Après 3h d'incubation, on prélève 1 mL de solution dont on va mesurer la densité optique. Sur le spectro choisir **OD600**, faire le Blank avec du LB Media, ensuite passer l'échantillon. **On arrête l'incubation quand la densité optique aura atteint 0.500** (la densité optique est proportionnelle à la quantité de bactéries présentes en solution ; OD=0.500 correspond à la quantité de bactérie idéale pour commencer à faire produire la protéine)

II/ STIMULATION DE LA PRODUCTION DE NOTRE PROTEINE

- Une fois l'OD arrivée à 0.500, on ajoute dans chaque erlenmeyer 500 μ L d'IPTG à 1 M.
- On remet à incuber à 37°C sous agitation 230-250 tours/min pendant 2 heures. L'IPTG va servir de signal pour les bactéries pour commencer à produire la protéine que l'on veut. Juste après l'addition de l'IPTG, prélever 1 mL de culture, centrifuger 10 minutes à 4°C et 15000g, jeter le surnageant et conserver les cellules au -20°C. Ceci sert comme t = 0 de l'induction.
- Après \approx 1h de l'IPTG, mettre les centrifugeuses Sorval et Heraus à refroidir.
- Une fois les 2 heures écoulées, on arrête d'incuber. On prélève 1 mL dont on mesure l'OD (en s'attendant que ça soit vers 1-1.5). En croissance normale, ces bactéries se doublent leur population toutes les 20 minutes environ, mais lorsqu'elles se mettent à produire la protéine, les bactéries se multiplient beaucoup moins rapidement. La mesure de l'OD sert donc ici de contrôle. Si la protéine n'avait pas été produite, alors l'OD serait énormément augmenté en l'espace de 2 heures (vers OD =15-30). Prélever aussi 1mL de culture, centrifuger 10 minutes à 4°C et 15000g, jeter le surnageant et conserver les cellules au -20°C. Ceci sert comme t = 2h de l'induction.

III/ RECOLTE DES BACTERIES

- Mettre les cellules dans des flacons de 500 mL pour centrifugeuse (2 flacons). Centrifuger pendant 10 minutes à 4°C et 5000 rpm (Sorval, rotor SLA3000). Répéter avec le reste de la culture.
- Jeter le surnageant à l'évier après traitement avec un peu de l'eau de javel
- Resuspendre les cellules avec environ 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline). On utilisera une pipette de 10 mL avec laquelle on fera une série de va-et-vient du PBS de façon à décrocher les cellules du fond des tubes (le faire avec « délicatesse »--il ne faut pas mousser les bactéries).
- Peser un FALCON de 50 mL vide.
- Une fois le mélange (cellules + PBS) bien homogène, on le met dans le FALCON qu'on vient de peser. Rincer les tubes avec du PBS jusqu'à un volume maximal de 40 mL
- Centrifuger 20 minutes à 4°C et 4000 rpm, Heraus
- Jeter le surnageant
- Peser de nouveau le FALCON qui contient les cellules et en déduire la masse de cellules produites.
- Mettre le FALCON avec les bactéries à congeler au -80°C.
-

IV/ PREPARER LES CHOSES POUR LE LENDEMAIN

Vérifier qu'il y a assez de l'eau distillée (au moins 2 L) dans la chambre froide à 4°C pour le lendemain.

Vérifier qu'il y a assez de Prep Buffer (\approx 150 mL, 4°C), de lysozyme (20 mg, -20°C), de billes Glutathione (2 mL, 4°C), d'Inhibitor Cocktail P8465 (1 mL, -20°C)

Prep Buffer :

50 mM	NaH ₂ PO ₄ ,2 H ₂ O	mw = 156,01	3,90 g
300 mM	NaCl	mw = 58,44	8,77 g
2 mM	EDTA	mw = 292,24	0,292 g

Ajouter 450 ml de H₂O

Ajuster le pH à 8 avec NaOH (en pastilles puis en solution 1M)

Compléter à 500ml avec de H₂O

Filtrer avec un filtre stérile

Stocker à 4°C

Troisième jour

I/ CASSER LES BACTERIES ET RECUPERER LE SURNAGENT

- Sortir les cellules du -80°C et les laisser décongeler sur glace
- Préparation du Lys Buffer :
 - o 20 mL de Prep Buffer
 - + 20 μL de DTT à 1mol/L
 - + 0.5 mL de 20% Triton X-100 (c'est un détergent)
 - + 1 mL P8465 Protéase Inhibitor Cocktail (Il sert à empêcher l'activité de protéases qui détruiraient la protéine qu'on a fabriquée. La quantité de P.I.C dépend de la quantité de cellules qu'on a--cf. notice d'utilisation SIGMA, Protéase Inhibitor Cocktail for Bacterial Cell Extracts (product n°P8465). La solution des inhibiteurs est préparé avec les proportions suivantes : 43mg de poudre + 200 μL de DMSO(Dimethyl Sulfoxyde) + 800 μL d'eau. Aliquoter à 1 mL et stocker à -20°C)
- Resuspendre les cellules dans 20 mL de Lys Buffer (à l'aide d'une pipette de 20 mL en prenant soin de ne pas y aller «trop fort» .
- Préparer une solution de Lysozyme (à -20°C) : 20 mg de poudre + 2 mL d'eau
- Ajouter les 2 mL de Lysozyme aux cellules.
- Laisser incubé 30 minutes dans la glace.
- Pendant ce temps, aller refroidir la centrifugeuse Sorval rotor SS34 (celui qui prend les tubes de 30 mL) et l'Heraus
- Une fois les 30 minutes écoulées, prendre le FALCON contenant les cellules et aller au sonicateur. Le but de cette étape est de casser les cellules. Au départ les cellules se présentent sous l'aspect d'une solution très visqueuse. On va soniquer jusqu'à ce que le mélange devienne fluide. Il faut prendre soin que l'échantillon ne chauffe pas ; de temps en temps, on arrête de soniquer et on met les cellules sur glace. On sonique pour 2-3 minutes totales, dans les incréments de temps de 30-60s, avec les pauses de quelques minutes sur glace entre chaque sonication. On teste la fluidité des cellules à l'aide d'une pipette Pasteur. Quand c'est bien fluide, c'est que les cellules sont cassées. Maintenant, la protéine qui nous intéresse se trouve à l'extérieur des cellules.

II/ SEPARATION DE LA PROTEINE PAR UN GREFFAGE SPECIFIQUE

- Mettre les cellules dans un tube à centrifugeuse de 30mL. Centrifuger les extraits pendant 30 minutes à 4°C à 15000g dans la centrifugeuse Sorval.
- Pendant ce temps, laver les billes Glutathione : prendre 2 mL de billes Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Cat #17-0756-01) ; les mettre dans un FALCON de 50 mL. Les laver 3 fois avec 10 mL de Prep Buffer pendant 5 minutes dans la centrifugeuse Heraus à 4°C à 2500g (4000rpm).
- Une fois la centrifugation des cellules cassées est finie, prendre 10 μL du surnageant pour le gel (« avant billes »), et mettre le reste dans les billes de Glutathione lavées. Laisser incubé durant environ 3h30 à 4h00 sous agitation lente à la chambre froide pour que les billes Glutathione captent les protéines marquées avec GST.
- Vers la fin de l'incubation, préparer pour la suite :
 - 1) Couler le gel (normalement, un gel de 10%)
 - 2) Préparer le Buffer d'éluion : **20 mM Glutathione** (glutathione : MW 307.3 g/mol ; il se trouve sous forme de poudre dans le frigo à 4°C)
EX : pour 25mL de glutathione 20 mM:
0.1536g de poudre + 25mL de Prep Buffer
Il faut ensuite réajuster le pH à 8 grâce à une solution de NaOH à 1 M
NB : Le Buffer d'éluion va servir à décrocher les protéines qui sont sur les billes.
Il va donc nous servir à récolter la protéine que l'on veut.
 - 3) Préparer le Wash Buffer : 20 mL de Prep Buffer + 20 μL de DTT 1M + 0.5 mL de 20% Triton X-100

III/ RECUPERATION DE LA PROTEINE PURIFIEE

- Centrifuger 5 minutes à 2500g à 4°C ; prélevé le surnagent (normalement il n'y a plus, à ce stade, la protéine qui nous intéresse dans le surnagent ; mais par précaution on garde le surnagent au cas où la protéine ne se serait pas accrocher aux billes Glutathion).
- Pendant le temps de la centrifugation, il faut préparer
- Lavages des billes :
 - o Laver une première fois les billes avec $\approx 15\text{mL}$ de wash buffer ;
 - o Centrifuger 5 minutes à 4°C 4000 rpm puis jeter le surnagent.
 - o Ensuite laver 3 fois les billes avec $\approx 10\text{mL}$ de Prep Buffer ;
 - o Centrifuger 5 minutes à 4°C 4000 rpm puis jeter le surnagent.
- Resuspendre les billes lavées dans 2mL de Prep Buffer.
- Mettre, à l'aide d'une pipette pasteur, les billes dans une colonne de filtration.
NB : Ne pas prendre plus que 500 μL dans la pipette Pasteur, et prendre soin d'éviter de toucher les parois de la colonne et de mettre les billes bien au fond de la colonne. Les billes se collent sur les parois en verre de la colonne et à l'intérieur de la pipette ; **elles ne sont pas récupérables !!!!!**
- Laisser couler le buffer qui se trouvait dans les billes.
- Remplir la colonne avec du Prep Buffer (sans agiter les billes) et laisser couler le prep buffer
- **Récolte des protéines**

- Mettre 1mL de buffer d'éluion à 20 mM dans la colonne où se trouvent les billes. Agiter un peu les billes à l'aide de la pipette pasteur (attention, il ne faut pas aspirer, mais juste remuer à l'aide du bout de la pipette).
- Laisser reposer 15 minutes. Pendant ce temps, couler le stack du gel (15 puits) et mettre en marche le Thermobloc pour réchauffer les échantillons pour le gel
- Récouter la solution dans un tube de 1.5 mL. Numéroté ce tube #1
- Refaire la même chose encore 3 fois en numérotant successivement les tubes #2, #3 et #4. Arrivé à ce stade, la très grande majorité des protéines qui étaient accrochées aux billes sont maintenant décrochées et donc se trouvent dans les solutions #1, #2, #3 et #4.
- Ensuite refaire la même chose, mais cette fois ne pas laisser reposer le buffer d'éluion avec les billes. Récouter ainsi les tubes #5, #6, #7 et #8.

- **Gel d'électrophorèse :**

Pour vérifier que la purification a bien marché, on fait un gel d'électrophorèse où l'on met les échantillons prélevés aux différentes étapes de la préparation (ex : avant de mettre IPTG, après l'expression de la protéine, etc..) ainsi que les différents échantillons issus de la récolte de protéines que l'on vient de faire (#1, #2, #3 etc...).

En plus de vérifier que la purification des protéines a bien fonctionné, ce gel nous permet aussi de choisir quelles fractions des échantillons (#1, #2, #3 etc...) nous allons garder au final. Car on ne veut garder que les fractions les plus concentrées en protéines.

Préparer des échantillons :

- 1) Des cellules IPTG t=0 et t=2h : resuspendre dans 50 uL de 2xS.B. ; pipeter vigoureusement afin de casser l'ADN ; incubé 100°C, 15 min. ; charger 10 uL par puit
- 2) 10 uL de surnageant avant et après les billes Glutathione : resuspendre dans 10 uL 2xS.B. ; incubé 100°C, 15 min. ; charger 10 uL par puit
- 3) 10 uL chaque fraction : resuspendre dans 10 uL 2xS.B. ; 100°C, 15 min. ; charger 10 uL par puit

Migrer le gel ; colorer avec Coomassie (≈30 min) et décolorer (≈30 min)

IV/ DEMARAGE DE LA DIALYSE

Une fois qu'on a décidé les fractions à garder, on effectue une dialyse pour changer le tampon dans lequel se trouvent les protéines. (On veut par exemple passer ici à un tampon de PBS).

- On coupe la longueur de tube à dialyse nécessaire pour la quantité de protéine retenue. On le place dans un bêcher d'eau Milli-Q pour ouvrir le tube. Le tube à dialyse se trouve à 4°C chez Julie : MWCO 12-14000, Ø 6,4 mm. Couper 3 cm pour chaque ml de solution à dialyser et ajouter 8-10 cm pour pouvoir mettre les clips de fermeture.

NB : ne jamais toucher le tube à dialyse avec les mains nues. Toujours porter des gants.

- Mettre le tampon PBS froid dans une éprouvette de 1000 ml (le PBS froid vient de 2eme étage rue Lhomond)
- Agiter avec un barreau aimanté, mettre le sac à dialyse dans le tampon PBS pour qu'il s'imprègne, le vider, mettre un clip en bas et le remplir des fractions de protéines avec une pipette de 1000 ml, refermer avec un clip et mettre du papier aluminium sur l'éprouvette. Agiter (≈ 200).
- Laisser dialyser la nuit.

Quatrième jour

- En arrivant le matin, changer le PBS de dialyse, laisser dialyser encore 4 heures. Penser à refroidir la centrifugeuse Eppendorf. Penser à mettre les tubes de 250 uL étiquetés pour l'aliquotage à la chambre froide.
- Récouter les protéines du sac à dialyse avec une pipette Pasteur. Centrifuger à 25000g pendant 10 min à 4°C dans la centrifugeuse Eppendorf. Prendre le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml et aliquoter la protéine dans des tubes de 250 µl à 4°C (tubes pré-incubés dans la chambre froide). 40-50 fois 20 uL par tube et puis le reste en aliquots de 200 uL
- Congeler les protéines avec de l'azote liquide et mettre au -80°C.
- Faire un Bradford pour connaître la concentration des protéines.

Bibliographie

Adamson A.W. ,
Physical Chemistry of Surfaces
Wiley-Interscience publication, 1990

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994.
Molecular biology of the cell, third edition.
Garland Publishing, Inc.

Allen, P. G., C. B. Shuster, J. Kas, C. Chaponnier, P. A. Janmey, and I. M. Herman. 1996.

Phalloidin binding and rheological differences among actin isoforms.
Biochem. 35 :14062-9.

Amann KJ, Pollard TD. 2001
The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments.
Nat Cell Biol 2001 ;3 :306-310.

Bernheim-Groswasser A., Wiesner S., Golsteyn R. M., Carlier M.-F., Sykes C. 2002
The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters,
NATURE, 417 :308-311.

Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD. 2000
Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins.

Nature 2000 ;404 :1007-1011.

Boujemaa-Paterski R, et al. 2001
Listeria protein ActA mimics WASp family proteins : it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex.
Biochemistry 2001 ;40 :11390-11404.

Bray, D. 2001.
Cell Movements
2nd ed. Garland, New York.

Cameron L.A., Robbins J.R., Footer M.J., and Theriot J.A.

Biophysical Parameters Influence Actin-based Movement, Trajectory, and Initiation in a Cell-free System
Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 2312-2323, May 2004

Cameron, L. A., T. M. Svitkina, D. Vignjevic, J. A. Theriot, and G. G. Borisy. 2001.
Dendritic organization of actin comet tails.
Curr. Biol. 11 :130-135.

Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A. and Theriot, J. A.
Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 4908-4913 (1999).

Carlier M.F., Pantaloni D. and Korn E.D. 1984.
Evidence for an ATP cap at the ends of ac-

tin filaments and its regulation of the F-actin steady state.

J. Biol. Chem., Volume 259, 9983-9986.

Carlier M.F. and Pantaloni D. 1986.
Direct evidence for ADP-Pi-actin as a major intermediate in ATP-actin polymerization.

Rate of dissociation of Pi from actin filaments. Biochemistry, Volume 25, 7789-7792.

Carlier M.F. 1991.

Actin : Protein Structure and Filament Dynamics.

J. Biol. Chem., Volume 266, 1-4.

Carlier M.F., Ditry D., Erk I., Lepault J., Van Troys M.L., Vandekerckhove J., Perelroizen I., Yin, H., Doi Y., Pantaloni D. 1996
T β 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration.

Journal of Biological Chemistry, Volume 271, 9231-9239

Carlier M.F., Pantaloni D.

Control of actin dynamics in cell motility. 1997
J. Mol. Biol. 269 :459-467.

Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D.

Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover : implication in actin-based motility.

J Cell Biol. 1997 Mar 24 ;136(6) :1307-22.

Chaponnier, C., M. Goethals, P. Janmey, F. Gabbiani, G. Gabbiani, and J. Vandekerckhove. 1995.

The specific NH₂-terminal Ac-EEED sequence of alpha smooth actin plays a role in polymerization.

J Cell Biol. 130 :887-895.

Chisholm, R.L.,

<http://dicty.cmb.northwestern.edu/chisholm/overview.htm>

Condeelis, J. 1993.

Life at the leading edge : the formation of cell protrusions.

Annu. Rev. Cell Biol. 9 :411-44.

Coue M, Brenner SL, Spector I, Korn ED.

Inhibition of actin polymerization by latrunculin A.

FEBS Lett. 1987 Mar 23 ;213(2) :316-8.

De La Cruz, E., and T. D. Pollard. 1994.

Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments.

Biochem. 33 :14387-92.

Eda M., Yonemura S., Kato T., Watanabe N., Ishizaki T., Madaule P. and Narumiya S., 2001

Rho-dependent transfer of Citron-kinase to the cleavage furrow of dividing cells

Evans, E. 2001.

Probing the relation between force lifetime and chemistry in single molecular bonds.

Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30 :105-128.

Evans E. and Ritchie K. 1997

Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds. An Elastic Analysis of *Listeria monocytogenes* Propulsion
Biophys. J., Volume 72, 1541-1555.

Evans, E., and K. Ritchie. 1999.

Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains.

Biophys. J. 76 :2439-2447.

Evans, E., and A. Yeung. 1989.

Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration.

Biophys. J. 56 :151-160.

Eyring H.,

J. Chem. Phys. 3, 107 (1935)

F

Gerbal, F., V. Laurent, A. Ott, M. Carlier, P. Chaikin, and J. Prost. 2000.

Measurement of the elasticity of the actin tail of *Listeria monocytogenes*.

Eur. Biophys. J. 29 :134 -140.

Gerbal, F., V. Noireaux, C. Sykes, F. Julicher, P. Chaikin, A. Ott, J. Prost, R. Golts-teyn, E. Friederich, D. Louvard, V. Laurent, and M. Carlier. 1999.

On the *Listeria* propulsion mechanism.

Pramana J. Phys. 53 :155-170.

Gerbal F., Chaikin P., Rabin Y., Prost J.

An Elastic Analysis of *Listeria monocytogenes* Propulsion

Biophysical Journal, 2000, 79(5) 2259-2275

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.

Higgs HN, Pollard TD., 2001

Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex : activation by a diverse array of proteins.

Annu Rev Biochem 2001 ;70 :649-676.

Hill, T. L., and M. W. Kirschner. 1982.

Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly.

Int. Rev. Cytol. 78 :1-125.

Hill, T. L. 1987.

Linear Aggregation Theory in Cell Biology.

Springer-Verlag, New York.

Holt, Jeffrey R. and Corey, David P., 2000

Two mechanisms for transducer adaptation in vertebrate hair cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11730-11735

Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reaction.

Physica (Utrecht), Volume 7, 284-304.

Ishikawa R, Yamashiro S, Kohama K, Matsumura F.

Regulation of actin binding and actin bundling activities of fascin by caldesmon coupled with tropomyosin.

J Biol Chem. 1998 Oct 9;273(41) :26991-7.

Kumar, A., K. Crawford, L. Close, M. Madison, J. Lorenz, T. Doetschman, S. Pawlowski, J. Duffy, J. Neumann, J. Robbins, G. P. Boivin, B. A. OToole, and J. L. Lessard. 1997.

Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin.

Proc Natl Acad Sci USA. 94 :4406-4411.

Jordan M.A., Wilson L.

Microtubules and actin filaments : dynamic targets for cancer chemotherapy.

Curr Opin Cell Biol., 1998, 10(1), 123-30.

Kuo, S. C., and J. L. McGrath. 2000.

Steps and fluctuations of *Listeria monocytogenes* during actin-based motility.

Nature. 407 :1026-1029.

Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992.

L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein.

Cell. 68 :521-531.

Landau, L., and E. Lifchitz. 1967

Théorie de l'élasticité.

Mir, Moscow.

Lasa, I., E. Gouin, M. Goethals, K. Vancompernelle, V. David, J. Vandekerckhove, and P. Cossart. 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 :1531-1540.

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.

Lee S., Kim D. H. , and Needham D.

Equilibrium and Dynamic Interfacial Tension Measurements at Microscopic Interfaces Using a Micropipet Technique. 1. A New Method for Determination of Interfacial Tension

Kramers H.A. 1940.

Langmuir 2001, 17, 5537-5543

Loisel, T., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. Carlier. 1999.

Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins.

Nature 401(6753) : 613- 616.

Machesky L.M. 1999

Rocket-based motility : a universal mechanism ?

NATURE CELL BIOLOGY, VOL 1 :29-31

Machesky L. M. and Way M. 1998

Actin branches out

NATURE, VOL 394 :125-126

Machesky LM, Insall RH. 1998

Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex.

Curr Biol 8 :1347-1356.

Marchand J.B., Moreau P., Paoletti A., Cossart P., Carlier M.F. and Pantaloni D. 1995.

Actin-based movement of *Listeria monocytogenes* : actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface.

J. Cell Biol., Volume 130, 331-343.

Marcy Y., Prost, J., Carlier, M.F., Sykes C.

Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation.

P.N.A.S., 2004, 101(16), 5992-7

Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P., 1998

Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1.

EMBO J., 17(21) :6219-29.

McGough, A. 1998.

F-actin-binding proteins.

Curr Opin Struct Biol 8 : 166-176.

McGough, A., Pope, B., Chiu, W. and Weeds, A. 1997.

Cofilin changes the twist of F-actin : implications for actin filament dynamics and cellular function.

J Cell Biol 138 :771-781.

Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I. and Almers, W. 1999

Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells

Nat. Cell Biol. 1, 72-74.

Mitchison, T. J., and L. P. Cramer. 1996.

Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell. 84 :371-379.

Mogilner, A., and G. Oster. 1996.

Cell motility driven by actin polymerization.

Biophys. J. 71 :3030 -3045.

Mogilner, A. and G. Oster 2003

Force Generation by Actin Polymerization II :
The Elastic Ratchet and Tethered Filaments
Biophys J 84(3) : 1591-605

Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ.
Latrunculin alters the actin-monomer subunit
interface to prevent polymerization.
Nat Cell Biol. 2000 Jun ;2(6) :376-8.

Mounier, J., A. Rytr, M. Coquis-Rondon, and
P. Sansonetti. 1990.

Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with
F-actin in the enterocytelike cell.
Infect. Immun. 58 :1048-1058.

Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard.
1998.

The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 :6181-6186.

Noireaux, V., R. M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes.

Growing an actin gel on spherical surfaces.
Biophys. J. 78 :1643-1654. (2000)

Osawa, F., and M. Kasai. 1962.

A theory of linear and helical aggregations of macromolecules.

J Mol Biol. 4 :10-21.

Otterbein L. R., Graceffa P., Dominguez R. .
2001

The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State

SCIENCE, VOL 293 :708-711

Pantaloni D. and Carlier M.F.

How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4

Cell, 1993, 75(5), 1007-14.

Pantaloni, D., R. Boujemaa, 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.

Pécreaux J., Döbereiner H.-G., Prost J., Joanny J.-F. , and Bassereau P.

Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles

Eur. Phys. J. E 13, 277-290 (2004)

Peskin, C., G. Odell, and G. Oster. 1993.

Cellular motions and thermal fluctuations : to actin assembly.
the Brownian ratchet. Cell 1999 ;97 :221-231.
Biophys. J. 65 :316-324.

Plastino Julie, Lelidis Ioannis, Prost Jacques,
Sykes Cécile
The effect of diffusion, depolymerization and
nucleation promoting factors on actin gel growth
Eur Biophys J. 2003 Dec 9

Pollard T.D. and Borisy G.G. 2003
Cellular Motility Driven by Assembly and Dis-
assembly of Actin Filaments
Cell, Vol. 112, 453-465

Prost J.,
Physics of Bio-molecules and Cells, Les Houches
Session LXXV, 2-27 July 2001,
edited by H. Flyvbjerg et al.,
Les Houches Summer School Series, Vol. 75
(Springer, 2002).

Q

Rafelski, S., P. Lauer, D. Portnoy, J. The-
riot.
Skidding motility of mutant *Listeria* (2002).
<http://cmgm.stanford.edu/theriot/movies.htm>

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirch-
hausen T, Takenawa T, Kirschner MW. 1999
The interaction between N-WASP and the
Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals

Segura, M., and U. Lindberg. 1984.
Separation of non-muscle isoactins in the free
form or as profilactin complexes.
J Biol Chem. 259 :3949-54.

Sekimoto, K., F. Jülicher, J. Prost. Unpubli-
shed work.
(2001)

Sekimoto K., Prost J., Jülicher F., Boukel-
lal H., Bernheim-Grosswasser A.

Role of tensile stress in actin gels and a sym-
metry breaking instability
Eur Phys J E Soft Matter. 2004 Mar ;13(3) :247-
59

Sheterline, P., and J. Sparrow. 1994.
Actin.
Protein Profile. 1 :1-121

Smith, G. A., D. A. Portnoy, and J. A. The-
riot. 1995.

Asymmetric distribution of the *Listeria* mo-
nocytogenes ActA protein is required and suf-
ficient to direct actin-based motility.
Mol. Microbiol. 17 :945-951.

Southwick, F., and D. Purich. 1998.
Listeria and *Shigella* actin-based motility in
host cells.

Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 109 : 160 -172.

Stossel, T. P. 1994.

The machinery of cell crawling.

Sci Am. 271 :54-5, 58-63.

Straub, F. B. 1942.

Actin.

Stud. Szeged. 2 :3-15.

Svitkina TM, Borisy GG. 1999

Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia.

J Cell Biol 1999;145 :1009-1026.

Taunton, J., B.A. Rowning, M.L. Coughlin, M. Wu, R.T. Moon, T.J. Mitchison, C.A. Larabell.

Actin-dependent Propulsion of Endosomes and Lysosomes by Recruitment of N-WASP.

J. Cell Biol. 148 (2000) 519-530

Theriot, J. A., T. J. Mitchison, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy. 1992.

The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization.

Nature. 357 :257-260.

Theriot J.A., Rosenblatt J., Portnoy D.A., Goldschmidt-Clermont P.J. and T.J. Mitchison. 1994.

Involvement of Profilin in the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes* in Cells

and in Cell-Free Extracts.

Cell, Volume 76, 505-517.

Tilney, L. G., and D. A. Portnoy. 1989.

Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*.

J. Biol. Chem. 109 :1597-1608.

Upadhyaya, A., J. R. Chabot, et al.

Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles.

Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100(8) : 4521-6.

Van Oudenaarden A. and Theriot J.A. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility.

Nat Cell Biol. 1999 Dec ;1(8) :493-9.

Wegner, A., and J. Engel. 1975.

Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments.

Biophys Chem. 3 :215-25.

Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ. 1998

Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation.

Science 1998;281 :105-108.

X

Y

Zechel, K., and K. Weber. 1978.

Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels.

Eur. J. Biochem. 89 :105-12