



HAL
open science

Application de contraintes sur des systèmes complexes artificiels ou vivants : dégonflement de liposomes fonctionnalisés et réorganisation mécanosensible du cytosquelette de cellules Dictyostelium.

Jeremie Dalous

► **To cite this version:**

Jeremie Dalous. Application de contraintes sur des systèmes complexes artificiels ou vivants : dégonflement de liposomes fonctionnalisés et réorganisation mécanosensible du cytosquelette de cellules Dictyostelium.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00142229

HAL Id: tel-00142229

<https://theses.hal.science/tel-00142229>

Submitted on 17 Apr 2007

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

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

THESE

présentée par

Jérémy DALOUS

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Grenoble I - Joseph Fourier
Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement le

31 octobre 2006

**Application de contraintes sur des systèmes complexes
artificiels ou vivants : dégonflement de liposomes
fonctionnalisés et réorganisation mécanosensible du
cytosquelette de cellules *Dictyostelium***

JURY :	Cécile Sykes	Rapporteuse
	Boris Hinz	Rapporteur
	Alain Duperray	Président du jury
	Till Bretschneider	Examineur
	Annie Viallat	Codirectrice de thèse
	Franz BRUCKERT	Directeur de thèse

**Laboratoire : CEA Grenoble / DRDC / Biophysique et Biochimie des Systèmes Intégrés /
Groupe *Dictyostelium*, 17 av. des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 09**

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail en prenant de leur temps et pour les discussions que nous avons eues autour de ce dernier ou autour d'autres sujets. En particulier, je suis reconnaissant à **Cécile Sykes** et **Boris Hinz** d'avoir rapporté mon travail de recherche. Leurs conseils, remarques et suggestions m'ont été et me seront utiles. Merci à **Alain Duperray** d'avoir présidé mon jury.

Ma thèse s'est déroulée sous la direction de **Franz Bruckert**, en co-direction avec **Annie Viallat**.

Je souhaite remercier **Franz Bruckert** pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de *Dictyostelium discoideum* et, en général, le monde passionnant de la biologie cellulaire. Je te remercie de m'avoir fait confiance en me laissant prendre en charge le projet de collaboration avec l'équipe de **Günther Gerisch** du Max-Planck Institute of Biochemistry et d'avoir suivi mon travail lorsque j'étais à Grenoble mais aussi lorsque j'étais à Martinsried malgré la distance.

Je remercie **Annie Viallat** pour m'avoir permis de travailler au Laboratoire de Spectrométrie Physique avec les systèmes aussi simples que complexes que sont les liposomes géants. Merci pour ton dynamisme et ton enthousiasme.

J'ai beaucoup grandi durant cette thèse et je crois que vous avez, tous les deux, favorisé ce processus. Je vous remercie de m'avoir forcé à acquérir mon autonomie alors que j'ai pu montrer des signes de résistance. Si cette période de la thèse a été l'occasion d'un développement sur le plan professionnel et sur le plan personnel, c'est en partie grâce à vous.

Je remercie **Michel Satre** qui a, durant toute ma thèse, dirigé le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés du Département Réponse et Dynamique Cellulaires du CEA-Grenoble et qui m'a accueilli sans crainte vis-à-vis de ma formation de physicien. Malgré sa lourde tâche de direction, il a su rester disponible et a participé activement à la vie du groupe *Dicty*. Merci aussi pour tes conseils.

Je tiens à remercier les directeurs successifs de l'Ecole Doctorale de Physique de Grenoble (**Michel Schlenker**, **Bertrand Fourcade** et **Jacques Derouard**) pour leur disponibilité, leur écoute et leur implication dans des moments parfois difficiles.

Ayant travaillé au laboratoire de Spectrométrie Physique, je tiens à remercier mon ancien camarade de bureau **Manouk Abkarian**. Plus qu'un camarade de bureau, il m'a transmis son savoir-faire avec les vésicules géantes. Merci beaucoup à lui pour m'avoir aussi passé le relais en ce qui concerne la prise en charge des TPs « Biophysique de la Cellule ». J'ai pris beaucoup de plaisir à m'occuper de cet enseignement auquel il a su donner vie.

Je remercie **Colette Lartigue** pour ses conseils au début de mon travail au CERMO (LSP). Un grand merci aussi pour elle pour m'avoir aidé lors de l'annonce de ma soutenance de thèse en tant que chargée de communication au LMGP (ENSPG-INPG-MINATEC).

Merci aux nombreux stagiaires/thésards (**Laurent Thibaud**, **Benoît**, **Aurélien**, **Cyrille**, **Pauline**, ...) qui se sont succédés au Cermo et qui ont tous apporté leur touche personnelle à l'ambiance du labo. En particulier, merci à **Esther Champelovier** dont j'ai du m'occuper lors de son stage et avec laquelle j'ai beaucoup rit à un moment où la thèse ne me faisait pas beaucoup rire.

Ayant passé la plupart de mon temps au BBSI, je pense naturellement à tous les membres du groupe *Dicty* (et alentours) avec lesquels j'ai passé de bons moments et ai partagé de nombreuses expériences positives. Merci donc à **Laurence Aubry, Gérard Klein, Sara Mattei, Kareen Letellier, Christelle, Michel Satre, Viviane Caput, Marie-Pierre Mendez, Jeannine Bournet, Magali Demilly, Sébastien Fache, Sébastien Keller, Magalie, Nelly Bennett, Michel Ragno, Aleksandra Bogdanovic, Emmanuel Décavé, Franz Bruckert, François Chamaroux et Bertrand Fourcade**. Un merci spécial à Nelly pour son écoute. Un grand merci à Sébastien Fache avec lequel j'ai eu de nombreuses discussions et de vrais moments de pure rigolade absurde. Merci pour ton aide, ta compréhension et ton humour. Merci à tous pour votre présence, vos réponses et pour m'avoir aidé à un moment ou à un autre.

Du côté de Martinsried (Allemagne) où j'ai aussi passé une grande partie de ma thèse, je souhaite tout particulièrement remercier **Günther Gerisch** de l'Institut Max-Planck de Biochimie et les membres de son équipe. Ils m'ont permis de faire partie intégrante de ce groupe. Je remercie mille fois **Günther Gerisch** pour sa rigueur et son exigence scientifiques. Son exigence envers les autres n'a d'égale que sa passion de la recherche et son perfectionnisme, c'est-à-dire son exigence envers lui-même. Le projet que j'ai mené en collaborant avec lui ou ceux auxquels j'ai participé sous sa direction furent tous très excitants dans un cadre extraordinairement motivant.

Merci beaucoup à **Till Bretschneider** pour son aide précieuse en traitement et analyse d'images, pour tout le travail accompli ensemble, pour sa participation active dans l'écriture de l'article, et pour sa gentillesse. Merci aussi à **Frau Gerisch** (pour son aide administrative et sa gentillesse), à **Mary Ecke** (pour son aide très utile, toutes ses réponses au quotidien et sa précision), à **Annette Müller-Taubenberg** (pour les constructions qu'elle m'a permis d'utiliser, son aide dans l'écriture de l'article, sa recherche d'homologues de mécanorécepteurs chez *Dictyostelium* et ses conseils avisés), à **Jana Prassler, Emmanuel Burghardt, Theresa Schneider, Maria Zwermann, Marlis Fürbringer, Helen De Hostos, Evi Simmeth, Ursula Mintert et Ralph Neujahr**. Tous ont répondu à mes foules de questions et m'ont appris beaucoup en biologie cellulaire, plus spécifiquement au sujet de *Dictyostelium* et de la microscopie confocale. Je leur serai éternellement reconnaissant pour leur aide au quotidien et leurs réponses mettant en évidence leur maîtrise de leur domaine.

Merci aux étudiants du groupe notamment **Hellen Ishikawa, Martin Etzrodt et Konstantin Obuchowsky**. Je vous souhaite bon courage et plein de réussite.

J'ai eu l'occasion de rencontrer toutes les personnes de ce groupe en dehors du travail et les remercie chaleureusement pour leur gentillesse.

Merci à **Bernard Sartor** du CEA-Grenoble et au personnel de l'atelier du MPI für Biochemie de Martinsried. Merci aussi à **André Carminati, Gérard Commandeur et Jean-Claude Grenier** du Laboratoire de Spectrométrie Physique. Votre aide ponctuelle au début ou (pour Bernard) tout au long de ma thèse me fut fort utile et m'aura permis d'utiliser d'excellents dispositifs (chambres de dégonflement ou à flux) pour mes expériences. Un grand merci à André (Dédé) et Bernard pour les discussions sympas qui parfois, je le confesse, ne focalisaient pas uniquement sur le travail. Shame on us !

Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'être moniteur au **CIES de Grenoble**. J'ai pris beaucoup de plaisir à enseigner et ai suivi les formations du CIES avec beaucoup d'intérêt. Merci donc au centre pour son encadrement et ses formations. Je tiens en particulier à remercier **Michèle Vuillet** pour sa disponibilité, son écoute et ses conseils. Un très gros merci à **Hervé RRRaynaud** pour son ouverture d'esprit communicative et ses conseils. Ses stages

de formation furent vraiment des souffles d'air frais. Merci à **Pierre Aldebert** avec lequel j'ai eu le plaisir de travailler dans le cadre de l'atelier « Eveil aux sciences à l'école ». Ce fut un plaisir de discuter et de collaborer avec un personnage généreux et original. Merci à **Claude Gaubert** qui a su prendre le temps de m'écouter et de me conseiller. Ce fut un plaisir de discuter avec lui du métier d'enseignant-chercheur qu'il m'a décrit de façon passionnée et passionnante.

Merci à **Yannick Arnoud** et **Monique Giroud** qui ont dirigé les équipes d'enseignants dans lesquelles j'ai eu la chance d'enseigner. Ils ont été à l'écoute des remarques des enseignants confirmés comme des enseignants débutants, toujours avec le même objectif : rendre les enseignements plus intéressants, plus compréhensibles et plus pédagogiques.

Etant moniteur **CESIRE** (Centre d'Enseignement Supérieur et d'Initiation à la Recherche par l'Expérimentation), j'ai eu aussi la chance d'enseigner en laboratoires de recherche pour permettre aux étudiants de s'ouvrir au monde de la recherche dans le cadre d'expériences sur une thématique particulière. J'ai trouvé cette expérience très enrichissante et ai pu observer tout l'intérêt de rapprocher le monde universitaire du monde de la recherche. Je souhaite donc remercier toutes les personnes qui s'occupent de ce centre. En particulier, je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Manouk Abkarian** et à **Jacques Derouard** qui m'ont tous deux fait confiance en me donnant le relais pour prendre en charge les deux TPs CESIRE dont je me suis occupé et dont ils s'occupaient auparavant. Un grand merci pour cette opportunité qu'ils m'ont donnée et pour leur coaching initial.

Pas de thèse sans financement de thèse (au moins en sciences « dures »), je remercie donc le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et des Technologies (**MENRT**) pour le financement qu'il m'a accordé, via l'Ecole Doctorale de Physique de Grenoble, à l'issue de mon DEA. Merci au **CESIRE** de m'avoir donné accès à mon poste de moniteur.

Durant ma thèse, j'ai eu de nombreuses occasions de monter des dossiers de demande de financement pour prendre en charge, par exemple, le coût de mes déplacements en Allemagne. Je remercie donc l'**EMBO** (European Molecular Biology Organization) pour les deux bourses qu'elle m'a accordées et qui m'ont permis d'aller à plusieurs reprises en Allemagne. Je tiens à saluer chaleureusement à cette occasion les personnes qui ont accepté de soutenir ces demandes. En particulier, un grand merci à **Jean Müller** et **Michel Schlenker** pour la première application, puis à **Daniel Riveline** et **Erich Sackmann** pour la seconde. Je les remercie aussi pour les discussions très intéressantes que nous avons eues ensemble, sur mon travail et d'autres sujets. Chaque rencontre avec ces personnes me fut agréable et j'espère que d'autres suivront.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement l'**ARC** (Association pour la Recherche contre le Cancer) pour la bourse d'un an qu'elle m'a accordée, signe de son intérêt pour mon sujet de recherches. Les diverses rencontres qu'elle organise notamment entre chercheurs et son engagement contre le cancer en font une association utile.

Merci à tous **les thésards** que j'ai pu rencontrer et avec lesquels j'ai partagé des réflexions et passé de bons moments, thésards qui font avancer la recherche et sans lesquels les pailles mourraient vraisemblablement d'ennui.

Enfin, merci à mon entourage (**amis, famille**) qui m'a encouragé et supporté dans mes états divers et variés tout le long de cette thèse à Grenoble et à Martinsried. Un merci spécial à l'**IVS** (International Valbonnais Society) dont les membres se reconnaîtront et avec lesquels j'ai passé d'excellentes soirées.

Merci à tous ceux qui sont venus à la soutenance et/ou qui m'ont envoyé leurs pensées et/ou qui m'ont aidé à organiser le pot (**ma mère, Stefanie, mes soeurs, Pierre et Elisabeth, Agnès et Jérôme, Christophe, Laëtitia, Céline, Anaïs et Thomas, David, ...**).

J'oublie probablement d'autres personnes. Qu'elles ne m'en tiennent pas rigueur, leur absence sur ces pages n'enlève pas la reconnaissance que je peux leur témoigner.

jeremie_dalous@yahoo.co.uk



Laboratoire de Spectrométrie
Physique
UMR 5588-CNRS/UJF
Grenoble



Max-Planck Institute of
Biochemistry
Cell Dynamics group
Martinsried Germany



GRENOBLE

Département Réponse et
Dynamique Cellulaires
Laboratoire de Biochimie et
Biophysique des Systèmes Intégrés
UMR5092 CNRS/CEA/INSERM/UJF



MENRT



TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	11
Introduction au premier volet de mon travail de thèse : Application de contraintes sur des systèmes artificiels, dégonflement de liposomes fonctionnalisés	13
I Introduction, état des connaissances : les liposomes, leur fonctionnalisation	17
1.1 Les membranes.....	17
1.1.1 Qu'est-ce qu'une vésicule ? Définitions	17
1.1.2 Les lipides	18
1.1.3 Des fluides bi-dimensionnels	20
1.2 Propriétés mécaniques des bicouches lipidiques.....	21
1.2.1 Elasticité de cisaillement (shear).....	21
1.2.2 Elasticité d'étirement (stretching)	22
1.2.3 Elasticité de courbure (bending).....	23
1.3 Les fluctuations thermiques	26
1.4 Morphologies de vésicules	26
1.4.1 Un modèle simple.....	26
1.4.2 Des modèles de plus en plus élaborés. La théorie ADE (Area Difference Elasticity)	28
1.5 Perméabilité des bicouches lipidiques.....	30
1.5.1 Processus diffusif à travers une membrane sans protéine	30
1.5.2 Différentes perméabilités selon le soluté	31
1.5.3 Formation de pores membranaires	32
1.6 Pression osmotique.....	33
1.6.1 Définition générale de la pression osmotique d'une solution.....	33
1.6.2 Application au cas du dégonflement de vésicules.....	34
1.6.3 Calcul pratique de la pression osmotique d'une solution	34
1.7 Les gels physiques.....	35
1.7.1 Introduction générale sur les gels physiques.....	35
1.7.2 La transition sol/gel et sa manifestation	35
1.7.3 Le gel d'agarose.....	36
1.7.4 Théorie du gonflement d'un gel, cadre de Flory (1953).....	37
1.7.5 Gonflement, dégonflement et morphologies de gels.....	38
1.8 Morphologies de globules rouges	41
1.9 Membranes lipidiques associées à des polymères.....	43
1.10 Vésicules soumises à un flux hydrodynamique	46
1.10.1 Mouvement de sphères rigides sous écoulement et près d'un substrat	47
1.10.2 Mouvement d'objets déformables sous écoulement et au contact d'un substrat ..	47
1.11 L'adhésion spécifique à un substrat	49
1.12 Objectif du travail de thèse, premier volet	52
II Matériels et Méthodes	53
2.1 Fabrication des liposomes	53
2.1.1 Les lipides utilisés	53
2.1.2 La méthode d'électroformation	54
2.1.2.1 Les lames ITO	54
2.1.2.2 Le dépôt de lipides	55

2.1.2.3 La chambre d'électroformation	55
2.1.2.4 La croissance des vésicules	56
2.1.3 La méthode de formation spontanée	57
2.1.4 Liposomes de DOPC avec solution interne aqueuse.....	58
2.1.5 Liposomes avec incorporation d'un gel d'agarose.....	58
2.1.6 Liposomes avec glycolipides	60
2.2 Microscopies	60
2.2.1 La microscopie à contraste de phase	60
2.2.2 La microscopie de fluorescence	63
2.3 Application d'un choc osmotique	67
2.4 Application d'une contrainte de cisaillement.....	70
2.4.1 Chambre à flux	70
2.4.2 Calcul de la contrainte hydrodynamique appliquée et du taux de cisaillement	72
2.4.3 Validation du calcul théorique	73
2.5 Traitement de surface, greffage de lectines.....	74
2.6 Acquisition, numérisation, traitement et analyse d'images.....	76
2.6.1 Acquisition et numérisation des images.....	76
2.6.2 Traitement et analyse d'images.....	76
III Résultats : Dégonflement de vésicules phospholipidiques : comparaison entre vésicules remplies d'une solution aqueuse et vésicules remplies de gel d'agarose.....	77
3.1 Dégonflement de vésicules remplies d'une solution aqueuse.....	77
3.1.1 Dégonflement progressif étape par étape (ou dégonflement lent)	77
3.1.2 Dégonflement rapide.....	79
3.2 Dégonflement de vésicules remplies de gel d'agarose.....	80
3.2.1 Dégonflement progressif étape par étape	80
3.2.2 Dégonflement rapide.....	83
IV Discussion	87
4.1 Dégonflement de vésicules remplies d'une solution aqueuse.....	87
4.1.1 Fragilité des vésicules remplies d'une solution aqueuse.....	87
4.1.2 Perte de lipides lors du dégonflement	87
4.1.3 Equilibre osmotique et théorie ADE dans le cas du dégonflement progressif.....	88
4.1.4 Morphologies particulières lors du dégonflement rapide : effet framboise et effet perle.....	89
4.2 Dégonflement de vésicules remplies de gel	89
4.2.1 Le gel confère une résistance à la déformation	89
4.2.2 Effet de rétention d'eau par le gel. La pression élastique du gel varie comme le carré de la concentration de gel.....	89
4.2.3 La cinétique de dégonflement de vésicules remplies de gel d'agarose n'est pas affectée par la présence du gel	92
4.2.4 L'apparition de cratères.....	93
4.2.5 L'apparition de morphologies originales, ressemblance avec les échinocytes	95
4.2.6 Hypothèse pour expliquer l'apparition de morphologies rappelant celles d'échinocytes avec les vésicules remplies de gel.....	96
4.3 Conclusion, perspectives.....	97
V Résultats, discussion : Système biomimétique de l'adhésion cellulaire.....	99

Introduction au second volet de mon travail de thèse : Application de contraintes sur des systèmes vivants, réorganisation mécanosensible du cytosquelette de cellules <i>Dictyostelium</i>	103
VI Introduction, état des connaissances : motilité cellulaire et mécanosensibilité	107
6.1 Qu'est-ce que la motilité cellulaire ?	107
6.2 Qu'est-ce que le cytosquelette ?	107
6.3 Description détaillée des réseaux du cytosquelette	107
6.3.1 Le réseau de filaments d'actine	108
6.3.2 Le réseau de microtubules	108
6.3.3 Le réseau de filaments intermédiaires	110
6.4 Différents types de motilités cellulaires (bactérie <i>Listeria monocytogenes</i> , fibroblaste, neutrophile, kératocyte, amibe <i>Dictyostelium</i>)	111
6.4.1 Motilité de bactéries comme <i>Listeria monocytogenes</i>	111
6.4.2 Motilité de fibroblastes	112
6.4.3 Motilité de neutrophiles	114
6.4.4 Motilité de kératocytes	116
6.4.5 Motilité de <i>Dictyostelium discoideum</i>	116
6.5 L'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i>	117
6.6 La migration cellulaire sur support solide	120
6.6.1 Première étape : l'émission de protrusions au front avant	121
6.6.1.1 L'actine	121
6.6.1.2 La polymérisation de l'actine en filament	121
6.6.1.3 Les filaments d'actine sont polaires	122
6.6.1.4 Hydrolyse de l'ATP et mouvement de tapis roulant (treadmilling)	124
6.6.1.5 Les protéines qui interagissent avec l'actine	124
6.6.1.6 La nucléation et la création de nouvelles terminaisons barbées	128
6.6.1.7 Modèle de nucléation dendritique avec treadmilling	130
6.6.1.8 Régulation des protéines se liant à l'actine	132
6.6.1.9 Tests biomimétiques	132
6.6.1.10 L'avancée du front avant : besoin d'un apport de membrane	132
6.6.2 La deuxième étape dans la migration cellulaire : l'adhésion des protrusions au support	134
6.6.2.1 Concepts généraux	134
6.6.2.2 L'adhésion chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	136
6.6.2.3 Complexes focaux et adhésions focales chez les eucaryotes supérieurs	139
6.6.3 Troisième et quatrième étapes dans la migration cellulaire : le détachement du substrat et la rétraction	141
6.6.3.1 Structure de la myosine-II	141
6.6.3.2 Production de forces par la myosine-II	144
6.6.3.3 Régulation de la myosine-II	145
6.6.3.4 Fonctions de la myosine-II dans différents processus biologiques. Rôle dans la migration cellulaire	146
6.6.4 Les microtubules dans la migration cellulaire	151
6.7 Chimiotactisme, voies de signalisation. Détection d'un gradient chimique, polarisation et orientation cellulaires	153
6.8 La production de forces et leur transmission au substrat	159
6.8.1 Trois types de forces	159
6.8.2 La mesure des forces exercées par les cellules	163
6.8.3 La transmission des forces au substrat	166

6.9 Réponses à l'application de forces mécaniques. Mécanosensibilité et mécanotransduction.....	167
6.9.1 Généralités.....	167
6.9.2 Les cellules endothéliales.....	170
6.9.3 Les cellules épithéliales.....	174
6.9.4 Les kératocytes.....	176
6.9.5 Les leucocytes.....	177
6.9.6 Les fibroblastes.....	180
6.9.7 La mécanosensibilité chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	185
6.9.8 Systèmes reconstitués.....	187
6.10 Objectif du travail de thèse.....	188
VII Matériels et Méthodes.....	191
7.1 Cultures cellulaires.....	191
7.1.1 Culture en milieu nutritif.....	191
7.1.2 Cellules en milieu non nutritif (starvation).....	193
7.2 Souches cellulaires utilisées.....	194
7.3 Conservation des souches cellulaires.....	196
7.4 Transformation des cellules : fabrication de souches mutantes.....	198
7.4.1 L'électroporation.....	199
7.4.2 Amplification de vecteur (ou de plasmide).....	199
7.4.3 Protocole de transformation par électroporation.....	201
7.4.4 Protocole de clonage de cellules <i>Dictyostelium</i> mutées.....	203
7.5 Préparation des cellules et de la chambre à flux pour les expériences sous flux.....	205
7.5.1 Mesure de la concentration cellulaire.....	205
7.5.2 Lavage des cellules.....	205
7.5.3 Traitement de surface des lames et lamelles.....	206
7.5.4 Chambre à flux latéral à lames.....	207
7.5.5 Calcul de la contrainte hydrodynamique appliquée.....	208
7.5.6 Chambre à flux latéral à lamelles.....	208
7.5.7 Calibration, vérification du bon fonctionnement de la chambre à lamelles.....	211
7.5.8 L'écoulement d'un béccher amont vers un béccher aval.....	215
7.6 Expériences de chimiotactisme.....	217
7.7 La microscopie confocale à balayage laser (Laser Scanning Microscopy).....	218
7.7.1 Couplage des balayages de la source et du détecteur.....	219
7.7.2 Les trous d'épingle (pinholes).....	220
7.7.3 Schéma d'un épimicroscope confocal.....	221
7.7.4 Résolution du microscope confocal à fluorescence.....	222
7.7.5 Réglages de la brillance et du contraste.....	223
7.7.6 Les sources, filtres d'émission et miroirs dichroïques utilisés.....	223
7.8 Le développement des protéines fluorescentes : la GFP et la mRFP.....	224
7.9 Traitement et analyse d'images.....	227
7.9.1 Quantification du mouvement cellulaire sous flux (vitesse et directionnalité).....	227
7.9.2 Relocalisation de protéines, programme de détection par contours actifs.....	229
7.9.3 Quantification de la rétraction du bord cellulaire.....	234
VIII Résultats, première partie : Mise en évidence de plusieurs motilités cellulaires sous flux.....	237
8.1 Effet des conditions de culture cellulaire sur la motilité induite par un flux.....	237

8.2 Effet du flux hydrodynamique sur la motilité de cellules non-axéniques NC4a.....	242
8.3 Effet du flux hydrodynamique sur la motilité de cellules axéniques AX2-M en conditions de carence nutritive.....	247
IX Résultats, deuxième partie : Réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux et cinétiques de relocalisation de protéines.....	251
9.1 Effet du flux sur les cellules « sauvages » : polarisation et orientation cellulaires.....	251
9.2 Réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux.....	257
9.3 Relocalisation de la GFP-myo-II après un changement de sens du flux.....	260
9.4 Durant la réorientation sous un flux de 2,1 Pa, l'activité protrusive dépendant de l'actine précède la rétraction dépendant de la GFP-myo-II	264
X Résultats, troisième partie : Origine de la mécanosensibilité cellulaire.....	269
10.1 Rôle de la myosine-II dans la mécanosensibilité et relocalisation de l'actine sans myosine-II	269
10.2 Le front riche en Lim-GFP contre le flux est un site d'adhésion au substrat.....	272
XI Résultats, quatrième partie : Réorganisation du cytosquelette et réorientation cellulaire en réponse à un stimulus chimique. Comparaison au cas sous flux	277
XII Discussion.....	283
12.1 Différents types de motilités	283
12.1.1 Différentes motilités de <i>Dictyostelium discoideum</i> sous flux et dans un gradient chimique. Influence des conditions de culture	283
12.1.2 Différentes motilités sous flux de différents organismes. Migration dans le sens des forces ou contre les forces.....	285
12.2 Réorganisation du cytosquelette d'actine sous flux	286
12.2.1 Polarisation et orientation des cellules soumises à un flux	287
12.2.2 Réorientation après un changement de sens du flux, relocalisation de la Lim-GFP et de la GFP-myo-II.....	288
12.2.3 La diffusion n'est pas le facteur limitant dans la relocalisation des protéines	291
12.2.4 La polymérisation de l'actine au nouveau front avant précède la rétraction de l'arrière durant le processus de réorientation sous flux. Un lien complexe entre l'activité de contraction et la relocalisation de la GFP-myosine-II.....	292
12.3 Mécanosensibilité.....	294
12.3.1 Etude de la relocalisation en fonction des forces appliquées et mécanosensibilité	294
12.3.2 Comment expliquer la relocalisation plus rapide de Lim-GFP sous un taux de cisaillement plus faible ?	296
12.3.3 Mécano-récepteurs	297
12.3.3.1 Le rôle des microtubules dans la sensibilité aux forces mécaniques	298
12.3.3.2 La myosine-II ne joue pas de rôle dans la mécanosensibilité	298
12.3.3.3 Rôle du front avant contre le flux en tant que zone d'adhésion au substrat.	301
12.4 Réorientation sous flux versus réorientation en réponse à un stimulus chimique	302
12.5 Conclusion, perspectives	307
Conclusion générale	311
Références	313

ANNEXE: List of publications 335
Résumé/Abstract 336

Introduction générale

Les capacités d'une cellule de migrer, d'adhérer à un substrat ou à une autre cellule, et de sentir des forces mécaniques extérieures sont indispensables à de nombreux types cellulaires pour remplir de nombreuses fonctions biologiques.

De manière générale, la migration et l'adhésion cellulaires interviennent dans un grand nombre de processus biologiques importants. Par exemple, la cohésion des organismes pluricellulaires repose sur l'adhésion cellule-cellule. Le développement et l'organisation des organes (dans la morphogenèse, et en particulier l'embryogenèse) nécessitent la migration ordonnée de cellules les unes par rapport aux autres. Dans le processus de phagocytose, l'adhésion à la particule à phagocyter est une étape nécessaire. Au préalable, la cellule phagocytaire doit migrer jusqu'à la cellule ou la particule cible à ingérer. La propagation de métastases cancéreuses intervient lorsque des cellules malignes se détachent de la tumeur initiale et se lient à des cellules cibles. Par ailleurs les propriétés adhésives particulières des neutrophiles leur permettent d'adhérer aux vaisseaux sanguins à l'approche d'une plaie, et ainsi d'initier la réponse inflammatoire. Lorsqu'ils ont établi des liens avec la couche de cellules endothéliales, ils roulent sur celle-ci puis accroissent leur adhérence et entament une phase d'étalement-migration. Une fois la diapédèse effectuée, ils migrent par chimiotactisme jusqu'au site infecté. Les amibes *Dictyostelium* pour accomplir leur programme de développement migrent les unes par rapport aux autres dans des courants et établissent des contacts adhésifs pour former des agrégats de 10^5 cellules dont la forme évolue avec le temps. D'un point de vue industriel, dans le domaine de l'agroalimentaire, l'adhésion de micro-organismes sur les parois de matériaux utilisés pour l'emballage de produits alimentaires, est à l'origine de l'encrassement des récipients et fait l'objet de recherches permettant un meilleur nettoyage.

La mécanosensibilité est aussi très répandue dans de nombreux types cellulaires. Elle est centrale dans les cellules spécialisées qui permettent l'acquisition de sens tels l'ouïe et le toucher. D'autres cellules non spécialisées sont également mécanosensibles, comme par exemple les fibroblastes ou les cellules endothéliales. La capacité de sentir des forces mécaniques extérieures permet aux cellules de percevoir leur environnement et de s'organiser les unes par rapport aux autres dans un tissu, par exemple lors de l'embryogenèse. De plus, la vascularisation et le développement de pathologies telles que l'athérosclérose sont étroitement liées à la mécanosensibilité cellulaire.

Pour pouvoir observer, mesurer et finalement modéliser la migration, l'adhésion et la réponse mécanosensible des cellules, plusieurs approches sont possibles. Celle des biologistes consiste majoritairement à étudier le système extrêmement complexe qu'est la cellule (seule ou intégrée dans un tissu). Une autre approche, plus physique, consiste à simplifier le système « cellule » en reconstruisant un système biomimétique et en le fonctionnalisant de façon à lui conférer diverses fonctions que l'on souhaite étudier. Cette approche simplificatrice permet ainsi de réduire l'immensité des paramètres non contrôlés dans la cellule. Par exemple, il est possible d'insérer un canal protéique dans une membrane modèle de phospholipides dans le but d'étudier ses propriétés de transport ionique à l'aide de la technique de patch-clamp. Cette approche, outre des mesures simplifiées dans un système mieux contrôlé, permet de valider un modèle proposé en vérifiant que les ingrédients minimums de ce modèle suffisent à obtenir les effets attendus.

Lors de ma thèse, j'ai utilisé ces deux types d'approches en appliquant des contraintes mécaniques, dans un premier temps sur des liposomes fonctionnalisés et, dans une deuxième partie de ma thèse sur des cellules vivantes *Dictyostelium*.

Dans mon premier travail de recherches, j'ai observé et quantifié le dégonflement de systèmes passifs que sont les liposomes géants remplis d'un gel d'agarose, lorsqu'ils sont soumis à un choc osmotique (*Parties III et IV*). En remarquant que ces liposomes fonctionnalisés adoptent, dans certaines conditions de dégonflement, des morphologies semblables à celles d'échinocytes (formes particulières crénelées de globules rouges), j'ai tenté de proposer un modèle de morphogenèse expliquant l'apparition de ces formes.

Toujours dans le cadre de systèmes reconstitués, j'ai essayé de fabriquer des liposomes contenant des glycolipides de manière à étudier sous flux leur adhésion spécifique à une surface recouverte de lectines. Ces tentatives n'ont pas abouties et je présente quelques pistes utiles pour continuer ce travail (*Partie V*).

Dans un deuxième volet de recherches, j'ai travaillé avec des systèmes actifs que sont les cellules vivantes *Dictyostelium discoideum*. J'ai étudié la réorganisation du cytosquelette de cet organisme modèle en réponse à des forces hydrodynamiques de cisaillement. A l'aide d'une chambre à flux adaptée à mes besoins et à l'aide de différentes souches cellulaires et en particulier de plusieurs protéines de fusion fluorescentes, j'ai quantifié la relocalisation de protéines majeures du cytosquelette après un changement de sens du flux et ai validé l'utilisation d'outils permettant de mieux comprendre les mécanismes de mécanotransduction cellulaire sous flux (*Parties IX et X*).

Introduction au premier volet de mon travail de thèse

Application de contraintes sur des systèmes artificiels: dégonflement de liposomes fonctionnalisés

Lors de mes premiers travaux de recherche, j'ai fabriqué des systèmes biomimétiques artificiels et les ai soumis à des contraintes osmotiques ou hydrodynamiques. Dans ce cadre, j'ai utilisé la bicouche phospholipidique comme modèle de membrane cellulaire. Deux types de fonctionnalisations des membranes lipidiques ont été recherchées : la première consiste à remplir le milieu interne des liposomes d'un gel de polymère pour mimer le cytosquelette viscoélastique d'une cellule, la deuxième vise à mimer l'adhésion spécifique de cellules à une surface recouverte de lectines en incorporant des glycolipides dans la bicouche lipidique.

Ayant observé expérimentalement que le dégonflement de liposomes géants renfermant un gel d'agarose menait, dans certaines conditions, à des morphologies très semblables à celles d'échinocytes qui sont des formes prises par des globules rouges dans des conditions pathologiques, mes objectifs étaient de déterminer les conditions expérimentales menant à l'apparition de telles morphologies, d'enregistrer et de quantifier le dégonflement osmotique de ces objets, d'établir les cinétiques de dégonflement et de proposer un mécanisme pouvant expliquer l'apparition de ces formes.

Concernant l'adhésion spécifique de vésicules géantes à une surface greffée avec des molécules adéquates, mon objectif était de fabriquer des membranes phospholipidiques contenant des glycolipides afin d'observer sous flux l'attachement spécifique et le détachement de ces systèmes modèles avec des substrats de verre recouverts de lectines. Cependant, mes tentatives d'obtenir un tel système modèle artificiel mimant l'adhésion cellulaire spécifique n'ont pas abouti et je présenterai quelques pistes pouvant favoriser la continuation de ce travail ambitieux.

Ainsi, dans la partie I (*Introduction, état des connaissances : les liposomes, leur fonctionnalisation*), j'introduis toutes les notions utiles à la bonne compréhension de mon premier projet de recherches et je commence de façon générale par ce qu'est une bicouche phospholipidique. Je présente les propriétés mécaniques de ces membranes pour que le lecteur puisse se familiariser avec la physique de ces objets. En particulier, j'insiste sur les modèles théoriques permettant de trouver les formes d'équilibre de vésicules aqueuses, étant donné que je comparerai ces morphologies à celles de vésicules remplies de gel d'agarose. Dans mon projet de recherches, mon but étant de dégonfler des vésicules remplies d'un gel

d'agarose grâce à un choc osmotique, je me dois donc de présenter de façon générale les gels physiques, ainsi qu'une théorie du gonflement de ces gels et des travaux de gonflement/dégonflement de gels menant à l'apparition de morphologies variées de ces réseaux élastiques. Je parle aussi de la perméabilité des membranes pour expliquer le transport sélectif à travers une bicouche phospholipidique. Je définis brièvement ce qu'est la pression osmotique d'une solution et explique la méthode employée pour appliquer un choc hyper-osmotique. Ayant remarqué une forte ressemblance entre les morphologies acquises par les vésicules remplies de gel après leur dégonflement et celles de globules rouges crénelés, je présente la structure de ces cellules sanguines et aborde les travaux théoriques permettant de retrouver la séquence qui mène une hématie de la forme stomatocyte à la forme discocyte et enfin à la forme échinocyte. Enfin, je parle de publications rapportant la fonctionnalisation de vésicules avec des chaînes polymères pour montrer l'originalité de nos travaux consistant à introduire un gel physique dans le volume interne d'une vésicule géante.

Pour introduire la partie « adhésion spécifique sous flux », je mentionne l'équation hydrodynamique de Navier-Stokes et le mouvement de sphères rigides ou d'objets déformables sous écoulement et près d'un substrat. Dans un dernier paragraphe, je cite des travaux ayant abouti à la fabrication de vésicules fonctionnalisées adhérant spécifiquement à des surfaces traitées ou à d'autres vésicules et en particulier un travail d'attachement/détachement spécifique de vésicules géantes sous flux.

Dans la partie II (*Matériels et Méthodes*), je détaille les protocoles de fabrication des liposomes, en particulier la méthode d'électroformation qui fut la principale utilisée. J'aborde les fondements des techniques microscopiques utilisées dans ce premier projet (contraste de phase et fluorescence). Je décris la chambre de dégonflement que j'ai mise en place et utilisée pour la majorité des expériences de choc hyper-osmotique. En ce qui concerne les expériences sous flux hydrodynamique, je montre le dispositif expérimental de chambre à flux et rappelle le calcul théorique de la contrainte hydrodynamique appliquée. Après avoir mentionné le protocole de greffage des lamelles de verre avec des lectines, je mentionne les outils d'acquisition, numérisation, traitement et analyse d'images utilisés.

Dans la partie III (*Résultats : dégonflement de vésicules phospholipidiques : comparaison entre vésicules remplies d'une solution aqueuse et vésicules remplies de gel d'agarose*), je présente mes résultats expérimentaux de dégonflement de vésicules remplies de gel et compare leur comportement sous un choc hyper-osmotique à celui de vésicules aqueuses. Je montre que le dégonflement osmotique progressif d'une population de vésicules aqueuses provoque l'apparition de morphologies variées décrites par le modèle théorique

ADE (Area Difference Elasticity) avec souvent des scissions de vésicules. Au contraire, le gel empêche la division d'une vésicule en deux vésicules filles lors du dégonflement. De plus, le gel retient l'eau lors du dégonflement osmotique et ce d'autant plus que la concentration initiale d'agarose est grande et que la pression exercée sur les vésicules est grande. La présence du gel n'affecte pas les cinétiques de dégonflement mais stoppe précocement le dégonflement du fait de sa pression élastique. D'autre part, nous avons observé que ces liposomes fonctionnalisés acquièrent des morphologies crénelées lors de leur dégonflement rapide pour une concentration du gel comprise entre 0.07 et 0.18 % en masse. Ces formes originales avec pics ressemblent à celles d'échinocytes parfois prises par les globules rouges dans certaines conditions pathologiques. Nous proposons un mécanisme de formation d'une couche superficielle de gel effondré comme pouvant être à l'origine de l'apparition de ces morphologies originales (Partie IV : *Discussion*).

Dans la partie V (*Résultats, discussion : Système biomimétique de l'adhésion cellulaire*), je présente succinctement ma tentative de fabriquer des liposomes contenant des glycolipides et pouvant reconnaître spécifiquement une surface de verre recouverte de lectines. En analysant quantitativement le mouvement de ces vésicules sous flux, je n'ai pas pu mettre en évidence la création de liens spécifiques entre ces objets et la surface greffée. Je propose quelques hypothèses pour expliquer l'échec de ces tentatives et quelques pistes pouvant être exploitées pour continuer ce travail.

I Introduction, état des connaissances : les liposomes, leur fonctionnalisation

1.1 Les membranes

Les membranes permettent de délimiter des milieux différents tout en assurant une communication entre ces milieux. Elles assurent une perméabilité sélective entre deux milieux et gèrent ainsi la régulation des échanges. Elles interviennent dans le transport de molécules (par exemple le transport de l'hémoglobine et donc de l'oxygène par les globules rouges). Toute cellule de n'importe quelle espèce vivante possède une membrane plasmique délimitant son espace interne.

Le modèle choisi pour cette étude est la double couche phospholipidique géante ou vésicule phospholipidique géante unilamellaire¹.

1.1.1 Qu'est-ce qu'une vésicule ? Définitions

Le terme « **vésicule** » regroupe toute sorte de membrane refermée sur elle-même. Si la membrane est composée de molécules grasses, les lipides, les vésicules sont appelées **liposomes**. Les liposomes sont dits **unilamellaires** quand leur membrane est une bicouche moléculaire unique (Fig. 1_1). On les classe suivant leur taille : Small (20-50 nm), Large (50-500 nm) ou Giant (0.5-100 μm) Unilamellar Vesicles. Les SUV et les LUV peuvent être comparés à certains organites cellulaires : vésicules de sécrétion, vésicules de transport entre les compartiments internes de la cellule (appareil de Golgi), etc... Les liposomes géants ou GUV ressemblent davantage à la membrane plasmique de cellules (qui sépare le cytoplasme du milieu extérieur).

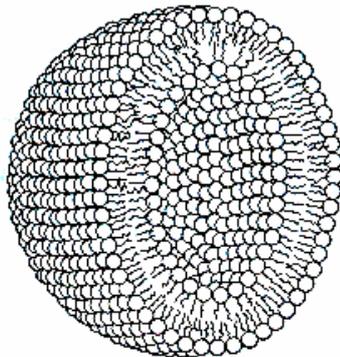


Figure 1_1: coupe d'une membrane lipidique unilamellaire sphérique.

¹ Dans cette partie consacrée aux liposomes, nous utiliserons indifféremment les termes vésicule ou liposome.

1.1.2 Les lipides

Les trois principaux types de lipides membranaires sont les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol.

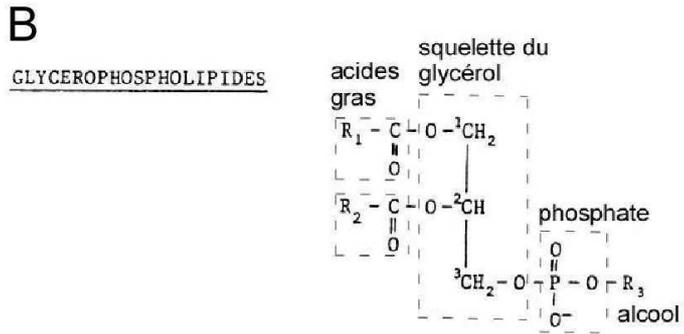
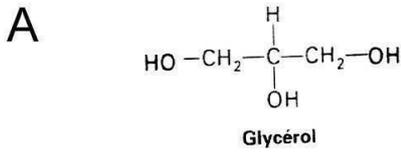
Les phospholipides sont dérivés soit du glycérol (on parle alors de phosphoglycérides ou de glycérophospholipides ; Fig. 1_2_A et B), soit de la sphingosine (pour la sphingomyéline qui est le seul phospholipide membranaire non dérivé du glycérol mais dérivé de la sphingosine ; Fig. 1_2_D et E).

Les phospholipides sont constitués de deux chaînes d'acides gras et d'une tête polaire avec un groupement phosphate (deux exemples dans la Figure 1_2_C). Les chaînes d'acide gras comportent habituellement un nombre pair d'atomes de carbone, typiquement entre 14 et 24. Les plus communes sont celles à 16 et 18 atomes de C. Chez les animaux, la chaîne hydrocarbonée n'est pas ramifiée. Elle peut être saturée (que des liaisons simples) ou insaturée (présence d'une ou de plusieurs doubles liaisons).

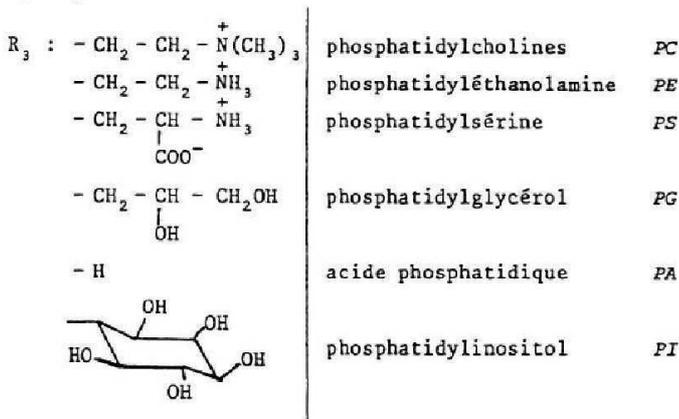
On note une chaîne hydrocarbonée C_n:_m, où n indique le nombre d'atomes de C et m le nombre d'insaturations. Par exemple, C18:1 [cis]-9, dont le nom est oléoyl et qui est la chaîne aliphatique du phospholipide DOPC (Fig. 1_2_C), est une chaîne comportant 18 atomes de carbone et une double liaison cis sur le 9^{ème} atome. Cette double liaison cis introduit un « coude » dans la chaîne.

Les glycolipides (aussi appelés glycosphingolipides) sont des lipides dont la tête polaire contient des oses (Fig. 1_2_F). Dans les cellules animales, les glycolipides dérivent de la sphingosine. Enfin, les membranes plasmiques des cellules eucaryotes sont habituellement riches en cholestérol (Fig. 1_2_G), tandis que les membranes des organites de ces cellules ont typiquement des quantités moindres de ce lipide neutre (Tableau 1_1).

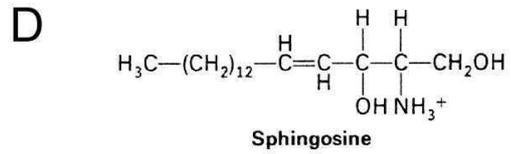
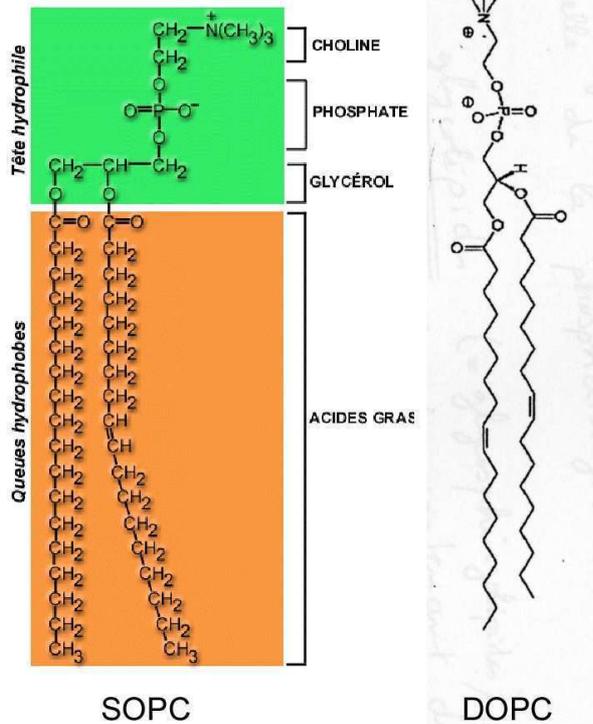
Les lipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent à la fois une partie polaire hydrophile (alcools phosphorylés, résidus osidiques, ...) et des groupements hydrophobes (les chaînes aliphatiques ou chaînes d'acide gras). Les molécules amphiphiles sont solubles dans les solvants organiques apolaires comme le chloroforme. Lorsque des phospholipides sont dans de l'eau, il apparaît des interactions antagonistes avec l'eau d'où une organisation spontanée donnant naissance à une structure dont la géométrie dépend de la forme initiale du phospholipide utilisé (Israelachvili, 1995). Cette organisation permet d'éviter le contact des parties hydrophobes avec l'eau en laissant les têtes hydrophiles exposées à l'eau.



R₁, R₂ chaînes aliphatiques

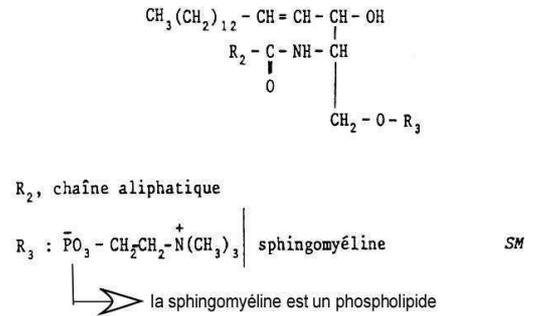


C Deux phospholipides



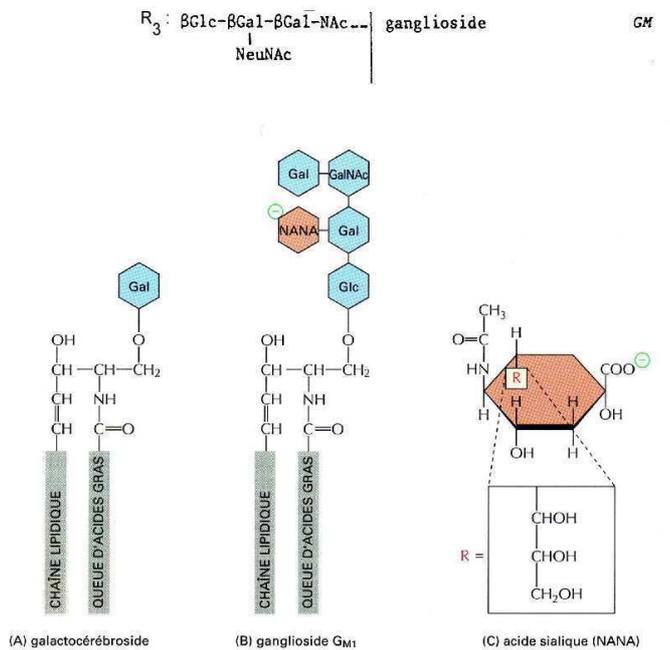
E

SPHINGOLIPIDES



F

shingolipides: exemples de glycolipides



G Le cholestérol

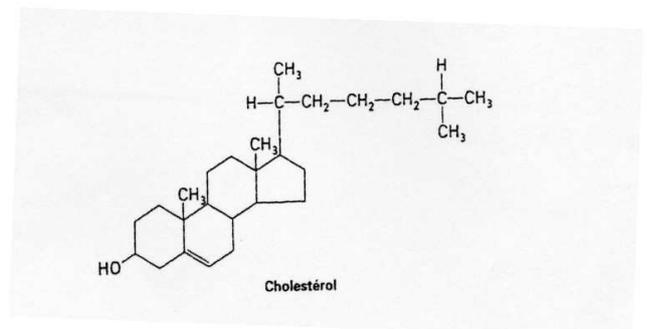


Figure 1_2: Les trois principaux types de lipides membranaires sont les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol (A, D, G tirés de Stryer, 1995; F tiré de Alberts et al., 1994).

Tableau 1-1: Compositions lipidiques approximatives de différentes membranes cellulaires (tiré de Alberts et al., 1994)

Lipides	Pourcentage des lipides totaux en poids					
	Membrane plasmique hépatique	Membrane plasmique des érythrocytes	Myéline	Mitochondrie (membranes interne et externe)	Réticulum endoplasmique	<i>E. coli</i>
Cholestérol	17	23	22	3	6	0
Phosphatidyl-éthanolamine	7	18	15	35	17	70
Phosphatidylsérine	4	7	9	2	5	traces
Phosphatidylcholine	24	17	10	39	40	0
Sphingomyéline	19	18	8	0	5	0
Glycolipides	7	3	28	traces	traces	0
Autres	22	13	8	21	27	30

1.1.3 Des fluides bi-dimensionnels

Les bicouches lipidiques sont des fluides bi-dimensionnels organisés. Une des propriétés essentielles des membranes phospholipidiques est l'existence d'une température de transition liquide-gel T_c (température de cristallisation) au-dessous de laquelle les chaînes lipidiques sont figées dans une phase cristalline (Needham and Evans, 1988; Sackmann, 1995). Au-dessus de T_c , la bicouche est dans une phase désordonnée dans laquelle les lipides sont libres de se déplacer latéralement.

La température de transition T_c dépend de la longueur des chaînes des acides gras et de leur degré d'insaturation. Ceci se comprend bien car ces deux paramètres vont influencer les interactions entre les chaînes. La phase cristalline, rigide, est favorisée par la présence de résidus d'acides gras saturés. Une double liaison *cis* dans une chaîne abaisse T_c , du fait de l'angulation de la chaîne qui rend plus difficile son interaction avec des chaînes voisines. Quand la longueur des chaînes d'acides gras augmente, T_c augmente, ce qui favorise donc l'état ordonné.

Les lipides sont susceptibles de diffuser latéralement dans la membrane (fluide bi-dimensionnel). Selon que la bicouche est dans l'état fluide ou cristallin, la mobilité des lipides

au sein de la bicouche lipidique est fortement changée. Dans la phase cristalline, le coefficient de diffusion translationnel varie entre 10^{-16} et 10^{-11} cm^2/s ; dans la phase fluide, la mobilité des lipides est plus grande et se situe entre 10^{-8} et 10^{-7} cm^2/s (Almeida et al., 1992). Ceci signifie qu'un lipide explore, dans la membrane, une région de 1 à 10 μm^2 en 1 s.

Les lipides peuvent également basculer d'un feuillet de la bicouche à l'autre. Ce mouvement de « flip-flop » est beaucoup plus lent que la diffusion latérale parce que la tête polaire doit traverser la partie hydrophobe (Fig. 1_3). A l'équilibre thermodynamique, le temps de demi-réaction pour que la moitié des lipides passe d'un feuillet vers l'autre varie de la journée à la semaine (Homan and Pownall, 1988).

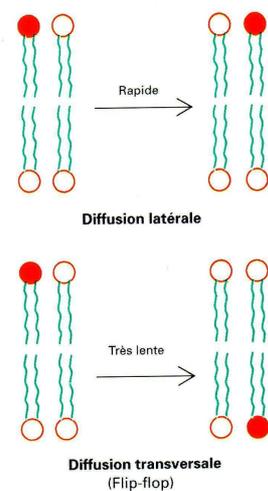


Figure 1_3: Diffusion latérale et diffusion transversale (tiré de Stryer, 1995).

1.2 Propriétés mécaniques des bicouches lipidiques

Une bicouche lipidique peut être assimilée à une feuille mince, légèrement déformée par rapport à sa forme d'équilibre. On peut alors se ramener à la théorie de l'élasticité des milieux continus. Pour caractériser les réponses mécaniques à une contrainte, Helfrich (1973) a introduit trois types d'élasticité : l'élasticité de cisaillement, l'élasticité d'étirement et l'élasticité de courbure (Fig. 1_4).

1.2.1 Elasticité de cisaillement (shear)

Le cisaillement d'un élément de surface peut être visualisé comme l'élongation dans une direction tangente à la membrane $L=L_0+\delta L$ et la compression dans une direction perpendiculaire $L=L_0-\delta L$ (toujours tangente à la membrane). L'aire de l'élément reste

constante pendant cette déformation. En fait, cette élasticité intervient dans les membranes dans leur état rigide ou dans les membranes biologiques à cause du cytosquelette mais est quasiment inexistante pour les bicouches lipidiques dans leur état fluide, les lipides étant libres de se déplacer les uns par rapport aux autres.

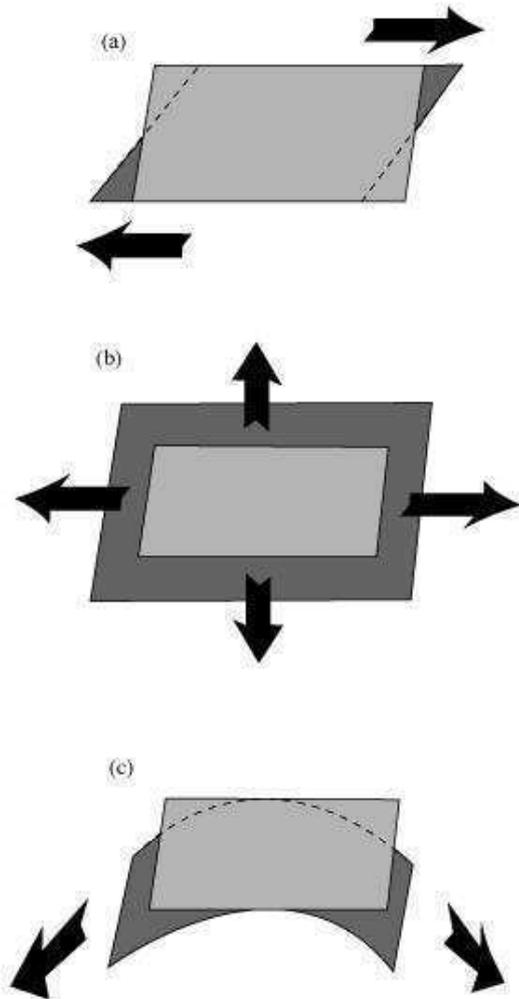


Figure 1_4: Contraintes de a) cisaillement, b) extension ou compression, c) courbure.

1.2.2 Elasticité d'étirement (stretching)

Les bicouches lipidiques présentent une grande résistance aux efforts de type compression-dilatation. Les interactions électrostatiques au niveau des têtes polaires luttent contre les efforts de compression alors que les interactions hydrophobes d'origine entropique luttent contre les efforts de dilatation (Israelachvili, 1995). Ces interactions entropiques cherchent à maximiser l'entropie en maximisant le nombre de configurations des molécules d'eau autour des lipides, de façon à minimiser l'énergie libre. Ce sont ces interactions

entropiques qui sont à l'origine de la formation des membranes lipidiques (Evans and Rawicz, 1990).

Une membrane présente deux régimes d'élasticité :

- A faible tension ($< 0.5 \text{ mJ.m}^{-2}$), l'aire totale de la vésicule varie peu, mais par contre, son aire apparente augmente, c'est-à-dire que l'amplitude des fluctuations thermiques diminue (Fig. 1_5).

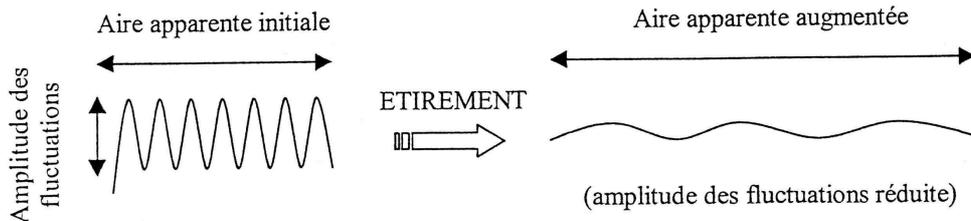


Figure 1_5: Augmentation de l'aire apparente sous étirement.

- Dans le régime des fortes tensions ($> 0.5 \text{ mJ.m}^{-2}$), la dilatation augmente proportionnellement à la tension, jusqu'à la rupture qui correspond au cas limite où l'énergie de traction est égale à l'énergie de cohésion hydrophobe.

L'augmentation maximale de l'aire totale d'une membrane avant qu'elle ne se rompe est faible, elle ne dépasse pas 3 à 4 % de l'aire initiale.

1.2.3 Elasticité de courbure (bending)

La membrane peut être également soumise à un mouvement de flexion, l'écartant de son plan tangent. Les bicouches phospholipidiques sont très flexibles. En effet, la déformation d'un film fin tel qu'une bicouche lipidique ne coûte qu'une faible énergie de courbure.

Dans l'espace, en chaque point d'une surface sont définis deux rayons de courbure principaux R_1 et R_2 . Ce sont les rayons de cercles osculateurs perpendiculaires, comptés négativement si le centre du cercle est situé à l'extérieur de la vésicule (Fig. 1_6). La courbure moyenne est alors définie par $H=1/R_1+1/R_2$. Par exemple, pour une sphère de rayon R , $H=2/R$, et pour un cylindre de même rayon, $H=1/R$. Comme H n'est pas suffisant pour décrire l'état de courbure d'une membrane (H peut être nulle même dans le cas d'une membrane courbée), on définit aussi la courbure de Gauss par $G=1/R_1R_2$. Deux exemples illustrent ces deux grandeurs (Fig. 1_7).

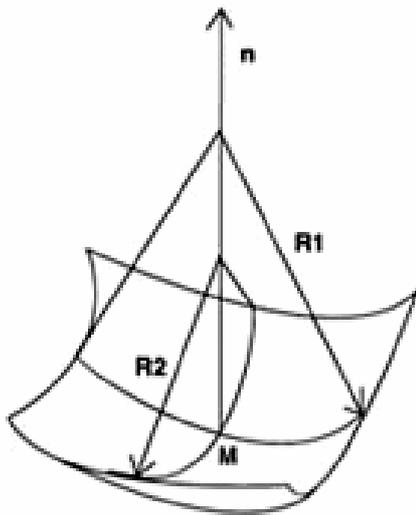


Figure 1_6: Rayons de courbure d'une surface en un point M.

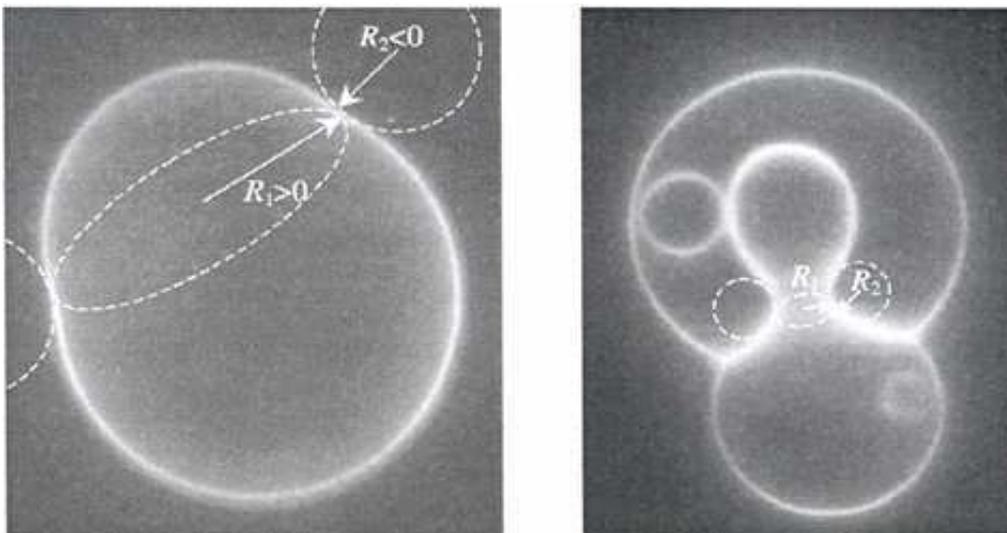


Figure 1_7: Courbures moyenne et Gaussienne. Photos avec cercles osculateurs.
 A gauche, vésicule en forme de poire : $H < 0$ et $G < 0$.
 A droite, invagination : $H \approx 0$ et $G < 0$ (semblable à une selle de cheval).

Quelle que soit la forme globale de la vésicule, l'énergie de courbure locale, par unité de surface, est donnée par une expression introduite par Helfrich (1973):

$$g_b = (1/2) \kappa H^2 + K'G \quad (1.1)$$

où κ et K' sont deux modules élastiques de courbure associés respectivement aux courbures moyenne et gaussienne. On peut remarquer qu'il n'y a pas de terme d'ordre impair en H du fait de l'invariance de l'énergie par rapport au signe de la courbure.

L'énergie libre totale de courbure de la membrane est l'intégrale sur toute sa surface de l'énergie de courbure d'Helfrich. Dans le cas de vésicules, la membrane est une surface

fermée et le second terme de g_b peut être ignoré. En effet, l'intégrale de la courbure gaussienne sur toute surface fermée est une constante. C'est un invariant qui ne dépend que de la topologie de la membrane.

κ est donc l'unique module élastique de courbure considéré. Il possède la dimension d'une énergie, et son ordre de grandeur est $\kappa \approx 10^{-19}$ J, soit de 10 à 20 fois l'énergie $k_B T$ d'agitation thermique. Plus κ est grand, plus l'énergie qu'il faut dépenser pour courber une membrane est grande. Pour un rayon de courbure d'environ 1 μm , on obtient donc des ondulations thermiques visibles impliquant une énergie de courbure par unité de surface $g_b \approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ J.m}^{-2}$.

Dans les liquides usuels, on ne tient jamais compte de cette énergie de courbure, car elle est négligeable devant la tension de surface, σ , qui est supérieure à 10^{-2} J.m^{-2} . Par contre, pour une membrane, σ peut être inférieure à 10^{-7} J.m^{-2} et l'énergie de surface est quasi nulle. L'énergie de courbure prend alors un rôle prépondérant.

Dans le cas d'une asymétrie entre les deux feuillet de la bicouche, si cette asymétrie peut s'exprimer au niveau local (c'est le cas d'une asymétrie qui apparaît quand les deux solutions interne et externe sont différentes, ou quand les deux feuillet de la bicouche sont composés de phospholipides de natures chimiques différentes, ou encore lorsque des particules, protéines, ou ions rentrent en interaction avec la membrane), il faut introduire, dans le modèle de Helfrich, une courbure spontanée c_0 dans l'énergie de courbure :

$$g_b = (1/2) \kappa (H - c_0)^2 \quad (1.2)$$

Même lorsque les lipides sont tous de même nature chimique, lorsque les deux solutions interne et externe sont rigoureusement les mêmes et lorsqu'il n'y a pas d'interaction avec des particules, il peut subsister une dernière asymétrie. Cette asymétrie, qui est globale, apparaît lorsque les deux monocouches qui constituent la membrane n'ont pas la même aire (par exemple, pas le même nombre de molécules, ou pas la même densité surfacique de molécules). Cette contribution à l'asymétrie de la membrane dépend de la forme géométrique globale de la vésicule, et ne peut donc être décrite dans l'expression locale de l'énergie de courbure spontanée g_b , comme cela a été fait juste au-dessus.

On peut néanmoins la décrire, grâce à un modèle élastique qui considère la différence d'aire des deux feuillet. Cette description est donc globale et considère la vésicule dans sa totalité.

En conclusion sur ces trois types d'élasticités, on peut dire que la déformation de courbure des membranes est prépondérante par rapport au cisaillement quasi-inexistant (au-dessus de T_c) et à l'étirement très faible. Une membrane lipidique est donc un fluide bidimensionnel incompressible qui se courbe relativement facilement.

1.3 Les fluctuations thermiques

L'énergie de courbure dont nous avons parlé plus haut s'oppose aux déformations de la membrane, mais cette énergie étant faible, l'agitation thermique suffit à provoquer des fluctuations incessantes de la membrane, fluctuations qui sont visibles au microscope optique. En effet les ondulations sont supérieures au micromètre. La membrane plissée des vésicules fluctuantes possède un réservoir conséquent d'aire cachée. On parle « d'excès de surface », défini comme l'aire ΔA récupérable en dépliant les fluctuations. A l'état complètement détendu (tension membranaire $\sigma = 0$), cette fraction ΔA représente 5 à 10 % de la surface moyenne projetée (Fig. 1_8).

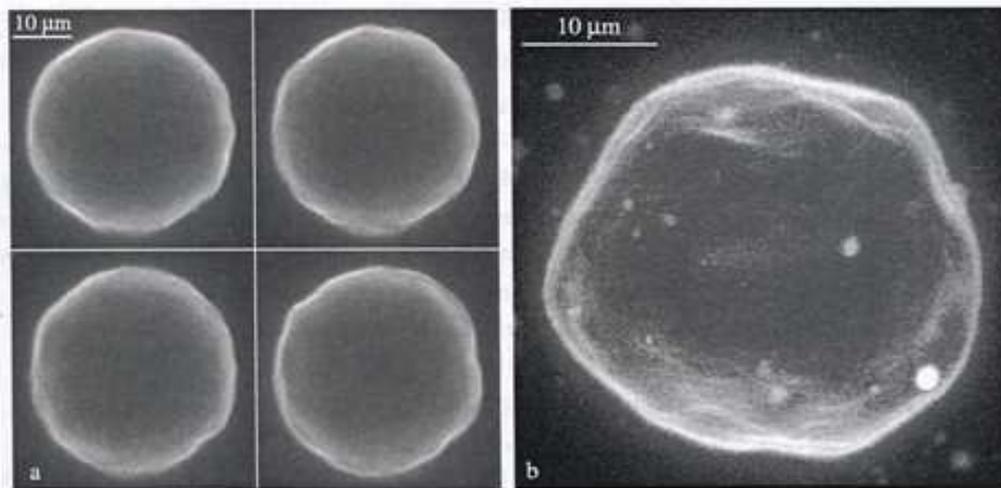


Figure 1_8: Fluctuations thermiques. Images de microscopie de fluorescence d'une vésicule géante fluctuante. **a)** Photos dans le même plan à différents instants, **b)** reconstruction à partir de plusieurs plans (tiré de Sandre, 2000).

1.4 Morphologies de vésicules

1.4.1 Un modèle simple

La recherche des formes d'équilibre de vésicules s'effectue en minimisant l'énergie libre de Helfrich et, en fait, uniquement l'énergie de courbure qui, comme nous l'avons vu, est

prépondérante dans le cas d'une bicouche à l'état fluide. Pour simplifier cette recherche, dans le cadre d'un modèle simple, plusieurs hypothèses sont faites :

- comme déjà dit, la membrane est dans l'état fluide (ce qui permet de ne considérer que l'énergie de courbure)
- les deux feuilletts sont symétriques (ce qui permet d'utiliser l'expression 1.1 pour l'énergie locale de courbure)
- la vésicule conserve la même topologie (pas de trous comme dans le cas d'un tore, pas de fission), ce qui permet de négliger le terme, alors constant, d'énergie de courbure gaussienne
- la surface totale de lipides, A , est constante.

Dans ces conditions, les formes d'équilibre théoriques dépendent d'un unique paramètre, le volume réduit, qui dépend de la surface et du volume de la vésicule (Seifert et al., 1991) :

$$v = 3V/[4\pi(A/4\pi)^{3/2}]$$

En particulier, la forme ne dépend ni de la taille de la vésicule, ni de la valeur de la rigidité de courbure. Le paramètre sans dimension v quantifie simplement le gonflement de la vésicule, la valeur $v = 1$ correspondant à une sphère, c'est-à-dire à la forme géométrique qui contient le plus grand volume V , pour une aire A donnée. Les valeurs de v strictement inférieures à 1 correspondent à des vésicules dégonflées. On obtient alors différentes morphologies axisymétriques qui sont fonction de v (Fig. 1_9). D et D^{sto} correspondent aux transitions discontinues prolate (cacahuète)/oblate (discoïde) et oblate/stomatocyte, respectivement.

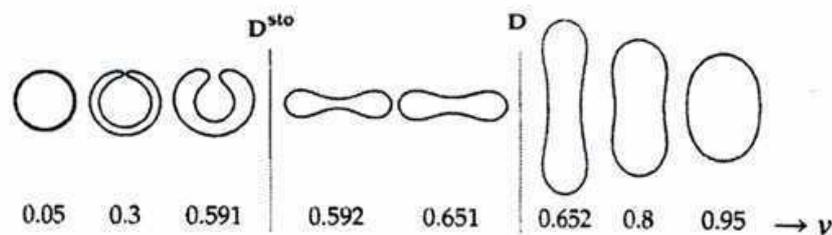


Figure 1_9: Morphologies théoriques de vésicules en fonction du volume réduit (tiré de Seifert et al., 1991).

Ainsi, ce modèle théorique simple prévoit des formes d'équilibre de vésicules, en fonction uniquement du volume réduit. Ces formes seront obtenues expérimentalement par Käs et Sackmann (1991). Certaines correspondent à des morphologies adoptées par des globules rouges sains (discocytes) ou malades (stomatocytes observés chez des personnes atteintes de drépanocytose ; Jay, 1975).

1.4.2 Des modèles de plus en plus élaborés. La théorie ADE (Area Difference Elasticity)

Cependant, d'autres formes pourtant observées expérimentalement ne sont pas prédites par ce modèle très simple : par exemple, les haltères dissymétriques ressemblant à des poires ou les formes en étoile de mer, ayant jusqu'à sept branches (Wintz et al., 1996).

Des modèles de plus en plus élaborés sont apparus pour expliquer le large éventail de morphologies de vésicules observées. Au début des années soixante dix, le modèle de la courbure spontanée a été proposé. Ce modèle utilise l'expression 1.2 pour l'énergie de courbure et prend donc en compte une courbure spontanée locale, c_0 , qui traduit l'existence d'une asymétrie locale entre les monocouches (compositions lipidiques différentes des deux monocouches, ou solutions internes et externes différentes, ou éventuelles interactions de la membrane avec des molécules, des particules). Les deux feuilletts ont, cependant, la même surface (Canham, 1970 ; Helfrich, 1973 ; Miao et al., 1991 ; Seifert et al., 1991). Le « modèle simple » présenté juste au-dessus n'est qu'une simplification de ce modèle.

Un peu plus tard est apparu le « modèle de couplage de la bicouche » (bilayer-coupling model ; Sheetz and Singer, 1974 ; Svetina et al., 1982 ; Svetina and Žekš, 1989 ; Seifert et al., 1991). Ce modèle prend en compte l'asymétrie globale induite par une différence d'aire entre les deux feuilletts. Dans ce modèle, les aires de chaque feuillet et donc aussi leur différence sont constantes.

Cependant, aucun de ces modèles ne put expliquer l'apparition de certaines formes (Wortis et al., 1993). Finalement est apparu le modèle ADE (Area Difference Elasticity model) dans lequel l'aire de chaque monocouche peut varier (localement et globalement) et s'étendre de manière élastique sous une contrainte d'étirement/compression (Fig. 1_10 ; Miao et al., 1994 ; Mui et al., 1995 ; Döbereiner et al., 1997). Dans ce modèle, les aires des deux feuilletts sont donc différentes et variables.

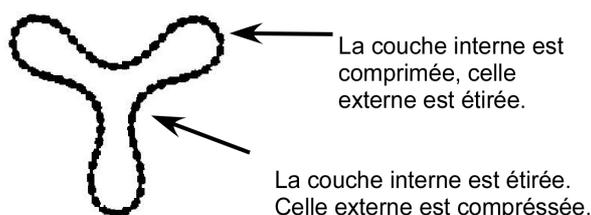


Figure 1_10: Le modèle ADE : déformations élastiques.

Prise en compte des variations d'aires locales (et globales) sous des contraintes d'étirement/compression.

Chaque monocouche est caractérisée par une surface relaxée (A_o^{int} ou A_o^{ext}) qui est déterminée uniquement par le nombre de lipides qu'elle contient. Mais chaque monocouche peut voir sa surface varier et a donc une aire plus grande ou plus petite (A^{int} ou A^{ext}) que celle relaxée. On peut donc définir la différence entre les aires relaxées :

$$\Delta A_o = A_o^{ext} - A_o^{int} = (N_{ext} - N_{int}) a_o$$

où N_{ext} et N_{int} sont les nombres de lipides dans les feuillet extérieur et intérieur respectivement, et a_o est l'aire relaxée occupée par chaque lipide. On peut aussi définir la différence entre les aires réelles des deux couches :

$$\Delta A = A^{ext} - A^{int}$$

Cette différence ΔA dépend de la forme globale de la vésicule.

Les deux énergies prises en compte dans le modèle ADE sont donc l'énergie du modèle de courbure spontanée (expression 1.2, intégrée sur toute la surface de la vésicule) et une énergie élastique d'étirement nécessaire pour avoir ΔA différente de ΔA_o , et calculée de façon globale sur la vésicule entière.

Cette théorie ADE conduit à un diagramme de phases unique avec seulement deux paramètres : le volume réduit v et une différence d'aires réduite effective Δa_o , qui tient compte à la fois de la courbure spontanée locale c_o du modèle de Helfrich, de la différence de surfaces relaxées entre les feuillet et de deux modules élastiques de courbure de la membrane : celui local déjà rencontré κ et un autre, non local, $\acute{\kappa}$ (Fig. 1_11).

On peut remarquer qu'expérimentalement les deux monocouches possèdent toujours des nombres de molécules différents. Ces nombres varient d'une vésicule à l'autre à l'intérieur d'une même préparation (le temps d'équilibrage des feuillet par flip-flop est supérieur au temps d'observation des vésicules).

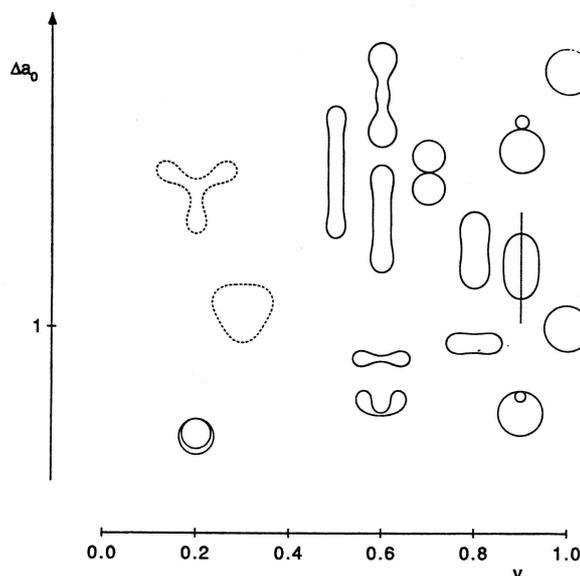


Figure 1_11: Diagramme de phases simplifié du modèle ADE (tiré de Mui et al., 1995). Axe des ordonnées : la différence d'aires réduite effective, Δa_o . En abscisse : le volume réduit. En pointillés : les formes non axisymétriques.

1.5 Perméabilité des bicouches lipidiques

Le mécanisme de transport passif au travers d'une membrane peut être soit une diffusion le long des squelettes hydrocarbonés lipidiques, soit une diffusion au travers de protéines membranaires facilitant le transport, soit un écoulement par des pores membranaires transitoires.

1.5.1 Processus diffusif à travers une membrane sans protéine

Pour traverser une membrane lipidique sans protéine, une molécule doit franchir la barrière de perméabilité que constitue le squelette hydrophobe. La perméabilité n'est pas définie uniquement comme une résistance du squelette hydrophobe de la membrane à la molécule de soluté. En effet, il faut aussi tenir compte de la barrière énergétique que forme la zone interfaciale constituée des têtes polaires lipidiques.

Lors du dégonflement d'une vésicule sphérique, si l'on fait l'hypothèse que la réduction de volume est gouvernée par la diffusion de l'eau à travers la membrane (pas de pore), la courbe $R(t)$ qui montre les variations temporelles du rayon de la vésicule permet, en principe, la détermination de la perméabilité de l'eau à travers la membrane, P . En effet, la perméabilité, qui a la dimension d'une vitesse, vérifie la relation suivante :

$$\frac{dR}{dt} = -\alpha P \Delta c$$

où Δc est la différence des concentrations molaires de soluté des solutions extérieure et intérieure et $\alpha = 18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ est le volume molaire de l'eau (Boroske et al., 1981).

En 1978, Fettiplace a mesuré la perméabilité de l'eau de diverses membranes artificielles en utilisant une méthode osmotique (Fettiplace, 1978). Il trouve une perméabilité de l'eau d'environ 35-40 $\mu\text{m/s}$ à 25°C pour des membranes de pur DOPC ou d'egg-PC. En utilisant comme lipide la sphingomyéline, la perméabilité est d'un ordre de grandeur plus faible que celle obtenue avec la phosphatidylcholine. Plus récemment, en utilisant une technique d'aspiration et de manipulation avec micropipette de manière à plonger des membranes dans un environnement hyper-osmotique, la perméabilité à l'eau a été mesurée au travers de vésicules géantes unilamellaires composées de lipides phosphatidylcholine PC poly-insaturés (Olbrich et al, 2000). La gamme de mesures des perméabilités de l'eau à 21°C se situe entre 30 et 40 $\mu\text{m/s}$ pour des phosphatidylcholines avec une insaturation sur une ou

les deux chaînes ($42 \pm 6 \mu\text{m/s}$ pour des membranes de DOPC) jusqu'à environ $150 \mu\text{m/s}$ pour du diC18:3.

La perméabilité à l'eau dépend donc de la composition lipidique et, en particulier, du nombre d'insaturations des chaînes hydrocarbonées. Plus le nombre d'insaturations est grand, plus la perméabilité est grande (Huster et al, 1997 ; Olbrich et al, 2000). De plus, les valeurs indiquées plus haut ont été mesurées au-dessus de T_c . En dessous de T_c , la perméabilité des membranes phospholipidiques diminue et peut atteindre des valeurs de l'ordre de $P \approx 10^{-1} \mu\text{m/s}$ pour l'eau.

En résumé, plus la membrane est ordonnée et condensée, plus la barrière est élevée et plus la perméabilité à l'eau est faible.

1.5.2 Différentes perméabilités selon le soluté

Les coefficients de perméabilité à travers une bicouche phospholipidique fluide ont été mesurés pour des molécules neutres solubles dans l'eau telles le glucose et le sucrose. Les valeurs trouvées, lorsque la membrane est à l'état fluide, sont d'environ $10^{-4} \mu\text{m/s}$ pour le glucose et de $3 \cdot 10^{-8} \mu\text{m/s}$ pour le sucrose (Alberts et al., 1994). De même que pour l'eau, le passage de la membrane de l'état fluide à l'état gelé entraîne une diminution brutale de la perméabilité pour ces molécules.

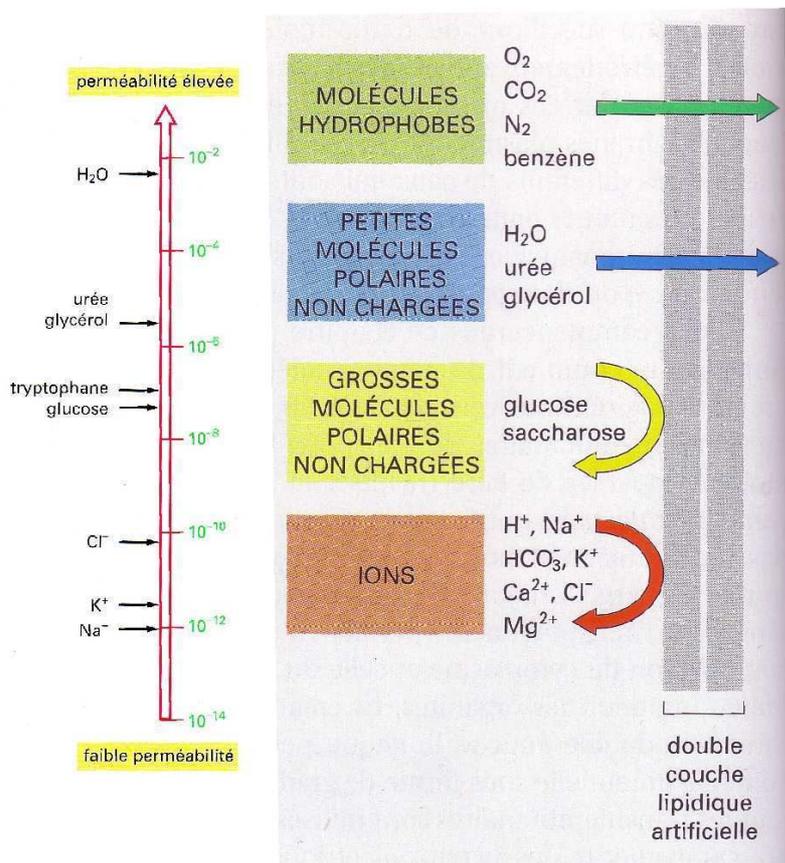


Figure 1_12: Ordres de grandeur de la perméabilité de molécules à travers une bicouche phospholipidique dans l'état fluide. Les valeurs sur l'axe sont données en cm/s. Le glucose et le sucrose ne traversent quasiment pas la membrane, comparativement à l'eau (tiré d'Alberts et al., 1994).

En comparant ces perméabilités avec celle de l'eau, on constate donc qu'une bicouche de phospholipides laisse passer l'eau très facilement alors que le sucrose et le glucose ne peuvent pratiquement pas traverser la membrane (Fig. 1_12).

1.5.3 Formation de pores membranaires

Si des pores apparaissent dans la membrane, le soluté sera détourné pour passer dans les pores qui présentent une résistance beaucoup plus faible à son passage que le squelette carboné. On a un écoulement de fluide à travers le pore.

Les pores apparaissent pour relaxer la tension membranaire. D'une manière générale, ils se forment spontanément dans les régions de la membrane riches en défauts. On peut artificiellement provoquer l'ouverture de pores en soumettant la membrane à des contraintes extérieures, comme, par exemple, un choc hypo-osmotique, un étirement mécanique dû à l'adhésion à un substrat, une illumination intense ou l'application d'un champ électrique (Fig. 1_13 ; Taupin et al., 1975 ; Sandre et al., 1999 ; Bernard et al., 2000 ; Tekle et al., 2001 ; Karatekin et al., 2003).

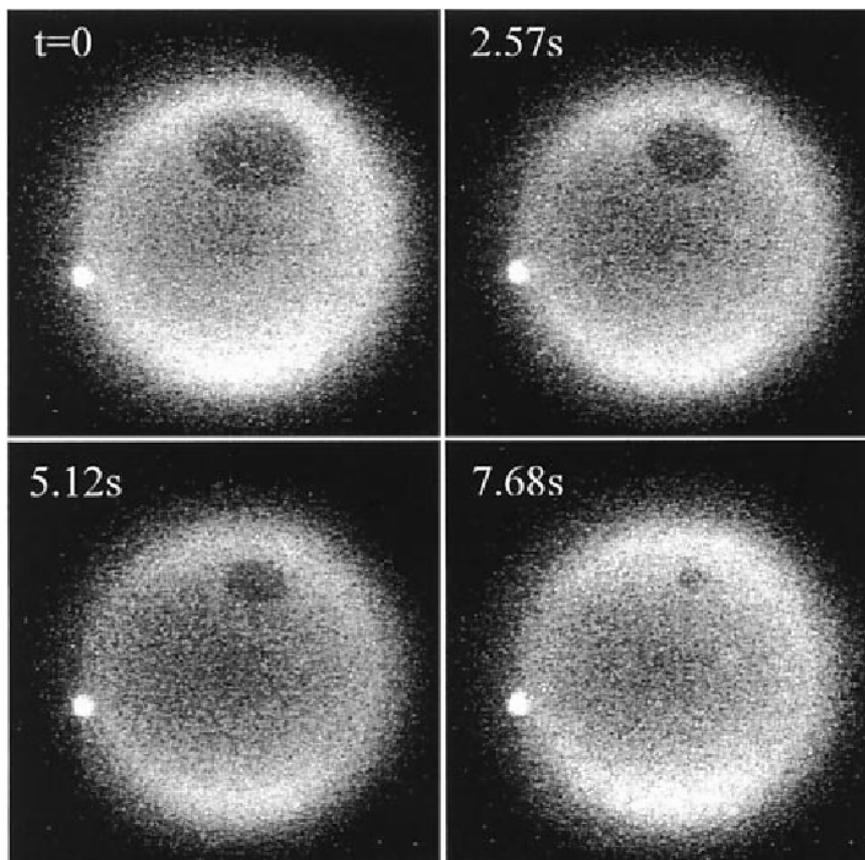


Figure 1_13: Fermeture d'un pore dans une vésicule tendue par illumination. L'addition de glycérol dans cette expérience ralentit considérablement le processus et permet l'observation de ce pore transitoire macroscopique (tiré de Sandre et al., 1999).

La durée de vie d'un pore dans un milieu aqueux est de l'ordre de 100-200 ms (Tekle et al., 2001 ; Karatekin et al., 2003).

On peut définir l'existence d'un pore en terme de tension de ligne γ , coût d'énergie libre par unité de longueur du bord exposé. La formation d'un pore dans la membrane engendre l'exposition à l'eau de chaînes hydrophobes lipidiques d'où la création d'un bord fortement courbé pour protéger ces phospholipides (Fig. 1_14).

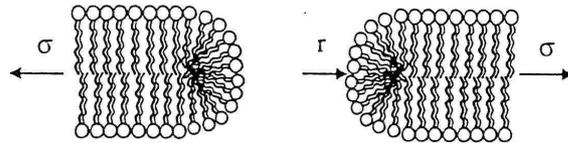


Figure 1_14: Pore montrant les lipides perturbés au niveau du bord.

On considère en général un pore comme un trou circulaire de rayon r dans une bicouche plane (Taupin et al., 1975). L'énergie E_p du pore de rayon r peut s'écrire :

$$E_p(r) = \gamma 2\pi r - \sigma \pi r^2$$

où σ est la tension de surface de la membrane.

$E_p(r)$ atteint un maximum quand $r = r^* = \gamma / \sigma$ et $E_p(r^*) = \pi \gamma^2 / \sigma$. Ceci signifie que lorsque $r < r^*$, le pore tend à se refermer tandis que si $r > r^*$, il tend à grossir indéfiniment jusqu'à éclatement de la vésicule. La tension de ligne γ pour une membrane de phosphatidylcholine est de l'ordre de 10^{-11} N ou $J.m^{-1}$ (Taupin et al., 1975 ; Karatekin et al., 2003).

1.6 Pression osmotique

1.6.1 Définition générale de la pression osmotique d'une solution

Considérons une cuve à deux compartiments, dans lesquels ont été placés respectivement une solution (solvant et soluté) et le solvant pur correspondant. Ils sont séparés par une cloison poreuse "semi-perméable", laissant passer les molécules du solvant, mais pas celles du soluté (Fig. 1_15).

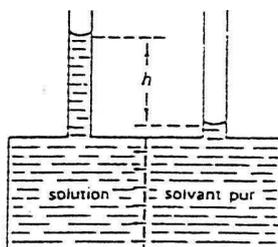


Figure 1_15: Membrane semi-perméable et osmose.

On constate que le solvant pur a tendance à migrer dans le compartiment de la solution. Les variations de volume dans chaque compartiment se traduisent par une variation de niveau dans les deux tubes : il baisse du côté du solvant et monte du côté de la solution. C'est le phénomène de l'osmose.

Ce phénomène s'arrête lorsque la différence de niveaux entre les deux compartiments crée une surpression hydrostatique suffisante pour s'opposer à l'entrée du solvant dans le compartiment de la solution. On appelle cette pression la pression osmotique de la solution.

1.6.2 Application au cas du dégonflement de vésicules

Lorsque la concentration extérieure à une vésicule (par exemple de glucose) est supérieure à la concentration intérieure (par exemple de sucrose), on parle de choc hyper-osmotique. La vésicule subit alors une différence de pressions osmotiques égale à $P_{osmo} = P_{glucose} - P_{sucrose}$. Avec les faibles concentrations utilisées dans mes expériences (de l'ordre de 100 mM), la pression osmotique est proportionnelle à la concentration du soluté, comme nous allons le voir dans la partie « *Calcul pratique de la pression osmotique d'une solution* ». La vésicule réagit au choc hyper-osmotique en expulsant de l'eau de manière à concentrer son milieu interne pour égaliser les concentrations intérieure de sucrose et extérieure de glucose et ainsi les pressions osmotiques. Elle a donc tendance à se dégonfler.

Dans le cas contraire (choc hypo-osmotique), il se créera un flux d'eau vers l'intérieur de la vésicule pour diminuer la pression interne par rapport à la pression externe. La vésicule a donc tendance à gonfler. Le soluté (sucrose) aurait également tendance à sortir de la vésicule, mais ce processus de transport à travers la membrane est beaucoup trop lent et en pratique n'a pas lieu sur l'échelle de temps de l'expérience. Si la vésicule gonfle trop, elle peut éventuellement éclater ou former des pores transitoires de façon à expulser rapidement un volume de solution interne, ce qui permet de relaxer sa tension membranaire.

Le choc osmotique est une manipulation très brutale : un gradient de concentration d'à peine 40 mM représente une différence de pression d'un bar de part et d'autre de la membrane.

1.6.3 Calcul pratique de la pression osmotique d'une solution

Un calcul thermodynamique à l'équilibre permet de montrer que dans une solution (solvant et soluté), la pression osmotique π de la solution vérifie:

$$\pi \cdot V_1 = RT \cdot m_2$$

où V_1 est le volume d'un kg de solvant et m_2 est appelée la molalité du soluté. C'est le nombre de moles de soluté par kilogramme de solvant. Cette formule n'est valable que lorsque la fraction molaire du soluté est négligeable devant la fraction molaire du solvant.

La molalité d'une solution, m_2 , est calculée dans des tables en fonction de la concentration du soluté dans la solution. Pour des concentrations de soluté peu élevées comme celles que nous allons utiliser, la molalité de la solution est proportionnelle à la concentration du soluté et la pression osmotique varie donc linéairement avec cette concentration.

1.7 Les gels physiques

1.7.1 Introduction générale sur les gels physiques

Les gels physiques constituent une catégorie intermédiaire entre les gels temporaires (qui n'établissent pas de connexion entre les macromolécules) et les gels chimiques (qui établissent des liaisons covalentes entre les macromolécules). Ces gels physiques sont constitués de chaînes pontées physiquement. Ces pontages non covalents ont une énergie petite, de l'ordre de kT (interactions coulombiennes, interactions dipôle/dipôle, interactions de van der Waals, liaisons hydrogène, transferts de charge, ...) et ne sont généralement pas ponctuels, mais au contraire correspondent à des zones de jonction plus ou moins étendues et ayant une structure plus ou moins ordonnée.

1.7.2 La transition sol/gel et sa manifestation

Par définition, la gélification est la transition de phase entre un état non gélifié dans lequel les macromolécules sont dissoutes et non réticulées (la solution est alors appelée « sol ») et un état gélifié dans lequel des jonctions entre ces macromolécules sont établies. Autrement dit, la gélification implique la formation d'un polymère géant (dont la taille est limitée par la taille du récipient, aussi appelé "bain de réaction") grâce à la bascule d'un « levier » physique (par exemple, un abaissement de température). Le taux d'avancement de la réaction, P , ou taux de liaisons formées, est le paramètre qui permet de caractériser l'état d'un

système au cours de son évolution. En particulier, les propriétés mécaniques macroscopiques du système en cours de gélification dépendent fortement du degré d'avancement de l'apparition de ces jonctions.

Soit P_c , la valeur de P au seuil de gélification.

Pour $P < P_c$, le système est un liquide dont la viscosité est d'autant plus grande que l'on approche de P_c . On a un ensemble de polymères de tailles variées mais finies.

Pour $P > P_c$, le système ne coule plus, la phase gel multiconnectée acquière une élasticité permanente.

1.7.3 Le gel d'agarose

Le gel d'agarose utilisé pour remplir le milieu interne des vésicules est un gel physique, thermoréversible. Il gélifie par abaissement de la température à environ 36°C pour des concentrations supérieures à 0.05 % en masse (Arnott et al., 1974). A haute température, les macromolécules présentent des configurations de chaînes désordonnées qui ne permettent pas leur association. L'abaissement de la température provoque une transition (cristallisation partielle) vers des configurations en hélices rigides (Selon le type de gel, les hélices peuvent être à simple brin ou multibrins. Elles sont doubles pour l'agarose.). Avec le temps, ces hélices s'associent pour former des fibrilles, qui sont des zones de réticulation, c'est-à-dire des agrégats d'hélices (environ 200 hélices pour l'agarose ; Fig. 1_16).

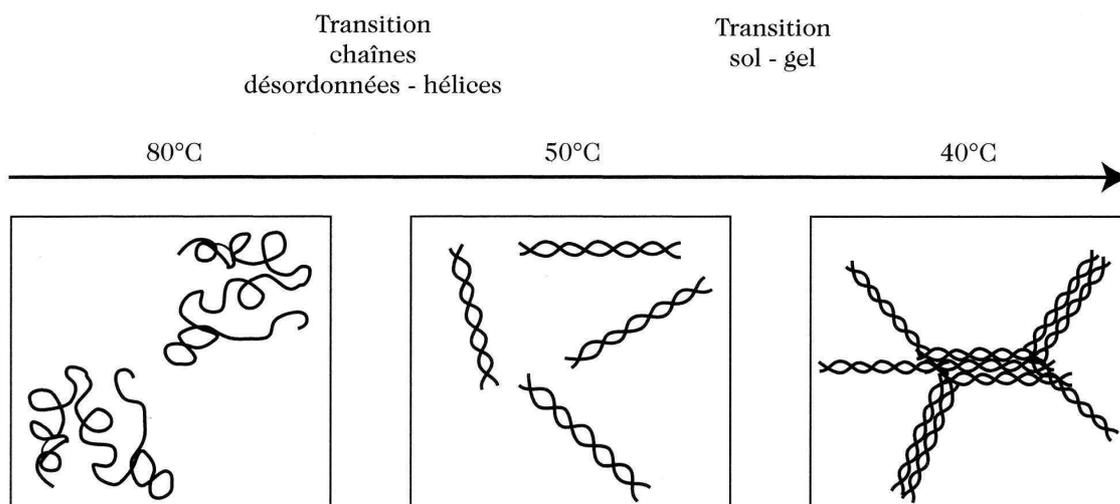


Figure 1_16: La transition sol-gel avec des macromolécules d'origine biologique. Formation d'hélices puis association de ces hélices (Tiré de Cabane et Hénon, 2003).

Lorsque le réseau de fibrilles s'étend à travers tout le volume disponible, le sol est devenu un gel. La cinétique de gélification est contrôlée par un mécanisme qui repose sur la nucléation, dans lequel l'étape limitante est l'agrégation d'hélices. Plus la température est faible (en-dessous de 40°C), plus la cinétique est rapide. A 40-50°C, nous avons observé que le début de gélification de nos préparations d'agarose apparaît en environ 30 minutes. Ce processus de gélification est réversible et il est possible de retrouver l'état sol en élevant la température. Cependant, du fait d'un fort hystérésis, la température de fusion des chaînes d'agarose dans l'eau est d'environ 100°C. Le module élastique d'un gel d'agarose dépend de sa concentration : il augmente environ de 10 à 10⁴ Pa lorsque la concentration d'agarose augmente de 0,07 à 1 % w/w².

1.7.4 Théorie du gonflement d'un gel, cadre de Flory (1953)

Un réseau de polymères tridimensionnel peut absorber une large quantité d'un liquide approprié avec lequel il est placé en contact. Lorsque le réseau de polymère gonfle, une force élastique apparaît qui s'oppose à ce phénomène. Au contraire, lorsque le réseau se mélange avec les molécules de solvant, cela permet d'augmenter le nombre de configurations du système solvant plus réseau, et donc d'augmenter l'entropie. Il y a donc une force de dilution qui tend à pousser le réseau à gonfler. Finalement, un état d'équilibre est atteint dans lequel ces deux forces s'équilibrent.

La variation d'énergie libre ΔF correspondant au mélange du solvant pur avec le réseau de polymères initialement pur, amorphe, sans contrainte (c'est-à-dire isotrope) est considérée comme étant la somme de deux termes : l'énergie libre de mélange ΔF_m et l'énergie libre élastique ΔF_{el} . Ainsi, il est possible d'écrire : $\Delta F = \Delta F_m + \Delta F_{el}$.

De plus, on peut écrire ΔF_m sous la forme :

$$\Delta F_m = kT (n_1 \ln v_1 + \chi^* n_1 v_2) \quad (1)$$

où n_1 et n_2 sont respectivement les nombres de molécules de solvant et de soluté, v_1 et v_2 sont respectivement les fractions volumiques de solvant et de soluté. χ est un nombre sans dimension qui caractérise l'énergie d'interaction entre le polymère et le solvant, par molécule de solvant et divisée par kT .

² w/w : en masse

On a : $v_1 = n_1/(n_1+x*n_2)$ et $v_2 = x*n_2/(n_1+x*n_2)$ où x est le rapport des volumes molaires du soluté et du solvant.

On peut écrire $\Delta F_{el} = -T*\Delta S_{el}$, où ΔS_{el} représente la variation d'entropie associée à la variation du nombre de configurations quand on déforme le réseau. On considère la déformation du réseau isotrope. En écrivant α le facteur de déformation linéaire, on peut écrire ΔF_{el} sous la forme :

$$\Delta F_{el} = (kTv/2)*(3\alpha^2 - 3 - \ln \alpha^3) \quad (2)$$

où v est le nombre effectif de chaînes dans le réseau, c'est-à-dire le nombre de chaînes entre deux points de réticulation. α vérifie $\alpha^3 = V/V_0$ où V_0 est le volume du réseau non sollicité et V est le volume du gel gonflé.

Le potentiel chimique du solvant dans le gel réticulé est donné par :

$$\mu_1 - \mu_1^\circ = N(\partial\Delta F/\partial n_1)_{T,P} = N(\partial\Delta F_m/\partial n_1)_{T,P} + N(\partial\Delta F_{el}/\partial\alpha)_{T,P}(\partial\alpha/\partial n_1)_{T,P} \quad (3)$$

où N est le nombre d'Avogadro.

De plus, on peut écrire la pression osmotique totale du gel, π , grâce à la relation :

$$\pi*V_1 = -(\mu_1 - \mu_1^\circ) \quad (4)$$

où V_1 est le volume molaire du solvant.

Cette pression osmotique du gel réticulé, π , comprend donc deux termes :

- un terme de mélange qui est la pression osmotique du mélange non réticulé solvant/polymères et dont l'action tend à faire gonfler le gel
- et un terme élastique du gel réticulé dont l'action tend à empêcher le gel de gonfler (dans le cas d'un gonflement) ou de se dégonfler (dans le cas d'un dégonflement).

1.7.5 Gonflement, dégonflement et morphologies de gels

Le gonflement et le dégonflement de gels sont des processus physiques qui attirent beaucoup d'attention de la part de la communauté scientifique notamment du fait du rôle de

ces processus dans de nombreuses applications (recherche en biologie, couches hygiéniques, couches bébés, industrie agroalimentaire, équipements sportifs, cosmétiques, industrie pharmaceutique, ...).

Ainsi, de nombreuses études théoriques et expérimentales décrivent quantitativement le gonflement et le dégonflement de gels en réponse à divers stimuli, comme l'application d'une pression hydrostatique (Tanaka et al., 1973 ; Hecht and Geissler, 1980), une variation de pression osmotique (Tanaka and Fillmore, 1979), une variation de température (Matsuo and Tanaka, 1988), un changement de composition du solvant (Matsuo and Tanaka, 1992).

De ces études ressort l'importance du coefficient de diffusion collective, D , qui caractérise les cinétiques de gonflement et de dégonflement des gels. D prend en compte l'aspect élastique du réseau de chaînes polymères réticulées et l'aspect de dissipation visqueuse due à la friction entre ces chaînes et les molécules du liquide jouant le rôle de solvant. Ainsi, D s'écrit :

$$D = E / f$$

où E est un module élastique qui caractérise le réseau de chaînes polymères. Il s'exprime en fonction de K et μ qui sont respectivement les modules élastiques d'étirement et de cisaillement du réseau seul (Tanaka et al., 1973). f est le coefficient de friction entre le réseau de chaînes polymères et le fluide du gel. D pour des gels polyacrylamide-eau vaut typiquement de 1 à $4 \cdot 10^{-7}$ cm^2/s pour des concentrations en acrylamide allant de $2,5$ à $6,5$ % en masse (Tanaka et al., 1973 ; Tanaka and Fillmore, 1979 ; Hecht and Geissler, 1980).

Dans certaines conditions de gonflement/dégonflement, les gels traversent une transition de phase volumique et cette transition est du premier ordre (Fig. 1_17 ; Matsuo and Tanaka, 1988 ; 1992).

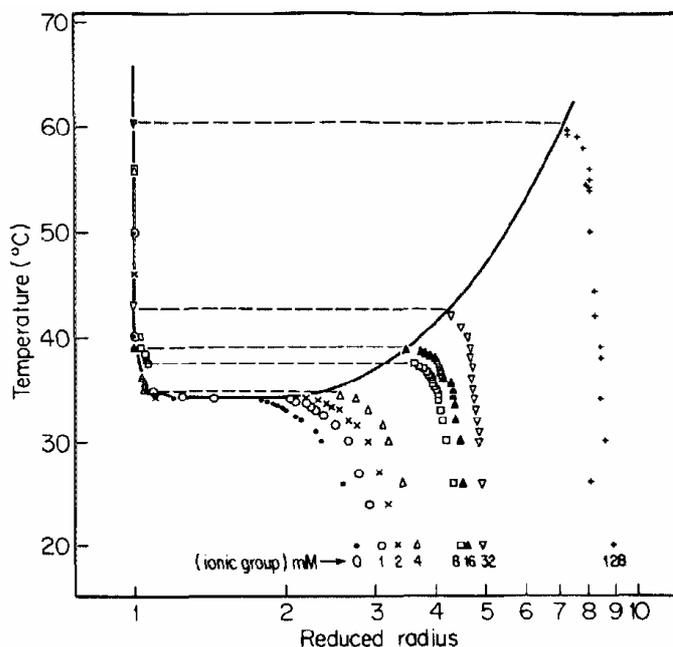


Figure 1_17: Rayons d'équilibre de billes de gels de N-isopropylacrylamide/sodium acrylate dans de l'eau pure en fonction de la température. La valeur en mM indique la concentration de sodium acrylate incorporé initialement dans la préparation. La transition est discontinue et le rayon varie fortement à la température de transition (Matsuo and Tanaka, 1988).

A la transition, on peut alors avoir des gels dont le volume change brutalement dans un rapport 1 à 1000 (Ilavsky et al., 1984). Lorsque des gels subissent un changement de volume suffisamment grand, il arrive que des morphologies particulières caractérisant la séquence de gonflement/dégonflement apparaissent (Matsuo and Tanaka, 1988 ; 1992). Ainsi, on peut voir des gels de polyacrylamide initialement cylindriques qui acquièrent des formes « bubble » ou des formes « bamboo » (Fig. 1_18 ; Matsuo and Tanaka, 1992 ; Boudaoud and Chaïeb, 2003), ou des gels initialement sphériques qui se dégonflent en faisant apparaître transitoirement des « bulles » sur toute leur surface (Fig. 1_19 ; Matsuo and Tanaka, 1988).

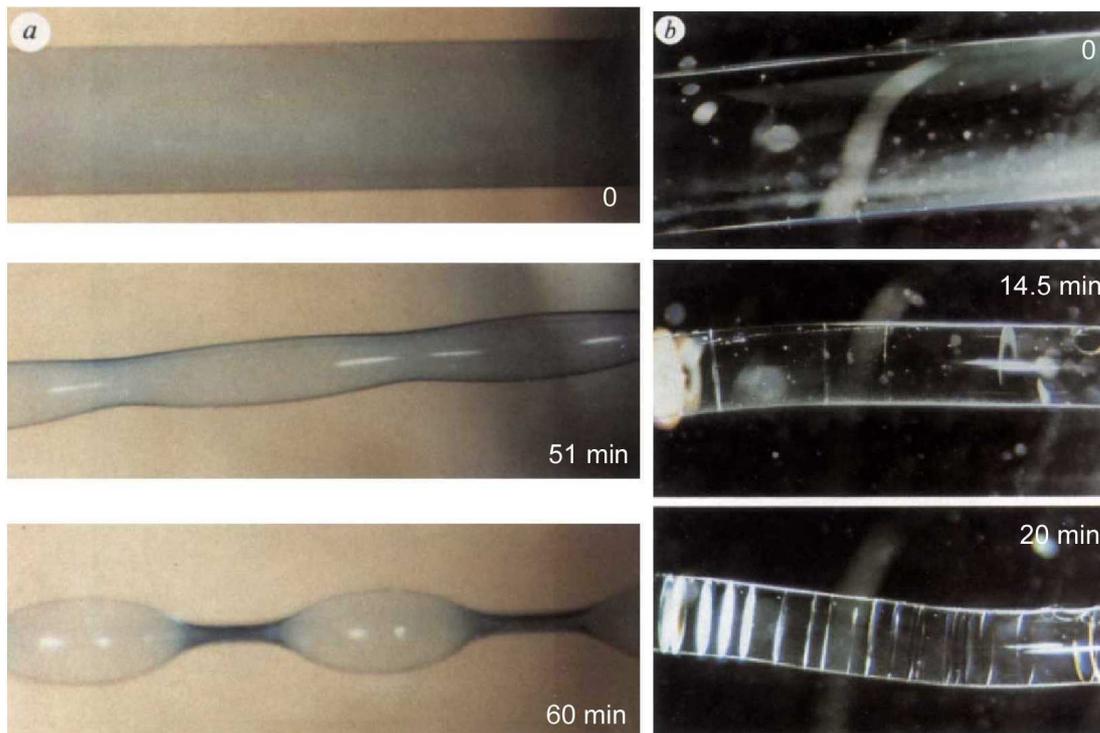


Figure 1_18: Dégonflement de gels et morphologies obtenues en fonction de la longueur finale du gel fixée par l'expérimentateur et en fonction de la concentration d'acétone de la solution eau-acétone dans laquelle le gel est plongé pour provoquer le dégonflement (tiré de Matsuo and Tanaka, 1992).

a) Morphologie "Bubble" qui apparaît sur un gel cylindrique d'acrylamide (16 mM sodium acrylate et 700 mM acrylamide) dont la longueur est conservée à 90% de sa longueur initiale relâchée et qui se dégonfle quand immergé dans une solution eau-acétone (30-70%vol).

b) Morphologie "Bamboo" qui apparaît sur un gel cylindrique d'acrylamide (32 mM sodium acrylate, 700 mM acrylamide) placé dans une solution à 85% d'acétone et dont la longueur est laissée libre. Cette morphologie correspond à des couches minces de gel effondré perpendiculaires à l'axe du cylindre. Le nombre de couches augmente avec le temps.

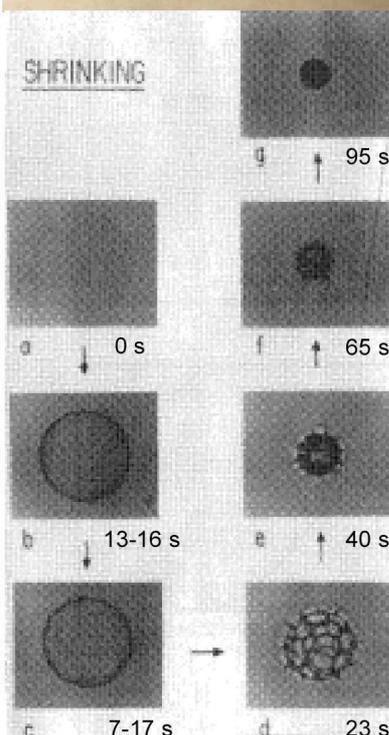


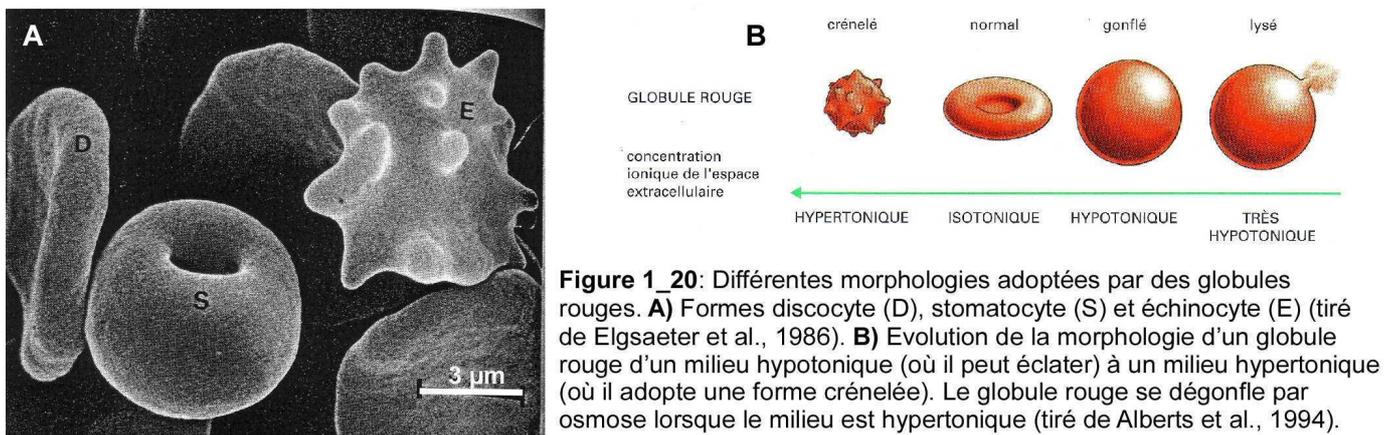
Figure 1_19 (gauche): Un gel sphérique de N-isopropyl-acrylamide est dégonflé en augmentant la température. Ce genre de morphologies transitoires sont observées à la surface d'un gel si il subit un changement de volume suffisamment grand (tiré de Matsuo and Tanaka, 1988).

Dans les deux cas, l'apparition de ces morphologies dans des gels qui se dégonflent semble s'expliquer par la formation d'une couche effondrée, dense et imperméable en surface. A l'apparition de cette couche imperméable, le dégonflement est stoppé momentanément. Le gel intérieur encore gonflé exerce une pression sur la couche en surface qui, dans le cas d'un gel sphérique, finit par éclater par endroits, ce qui provoque l'apparition de ces bulles en surface. Le gel continue alors son dégonflement et les bulles disparaissent.

Dans le cas de gels d'agarose, des expériences similaires ont été réalisées (Rochas et al., 1996 ; 1997). Le gel, soumis à un dégonflement uniaxial ou isotrope, subit une transition de phase avec l'apparition d'une couche supérieure de gel dégonflé au-dessus du reste du gel qui est toujours gonflé. Contrairement à un gel d'agarose non contraint, le gel dans la couche supérieure est bi-réfringent et fortement anisotrope en ce qui concerne ses propriétés élastiques. On a donc une transition de phase du premier ordre entre un état isotrope et un état anisotrope.

1.8 Morphologies de globules rouges

Les globules rouges (ou érythrocytes ou hématies) sont des cellules sans noyau possédant une membrane phospholipidique reliée à un cytosquelette. Ces cellules montrent une grande variété de formes adoptées en partie selon leur environnement (Fig. 1_20).



La plus abondante des protéines associées à la face cytoplasmique de la bicouche lipidique est la spectrine, une protéine fibreuse longue, fine et flexible, d'environ 100 nm de longueur, qui constitue environ 25 % de la masse des protéines associées à la membrane des globules rouges. C'est le principal composant du cytosquelette, réseau protéique qui est situé sous la membrane de l'hématie et qui maintient l'intégrité structurelle et la forme biconcave habituellement rencontrée de cette membrane. Les extrémités de plusieurs tétramères de

spectrine sont liées à de courts filaments d'actine et à une autre protéine (la bande 4.1) en un complexe de jonction formant ainsi un réseau résistant qui sert de base à toute la surface cytoplasmique de la membrane (Fig. 1_21). C'est ce cytosquelette à base de spectrine qui permet à l'hématie de résister à la contrainte exercée sur sa membrane lorsqu'on la fait passer à travers des capillaires étroits. La protéine en grande partie responsable de l'association de la spectrine du cytosquelette à la membrane plasmique de l'hématie s'appelle l'ankyrine. Elle se fixe à la fois à la spectrine et au domaine cytoplasmique d'une protéine transmembranaire appelée bande 3.

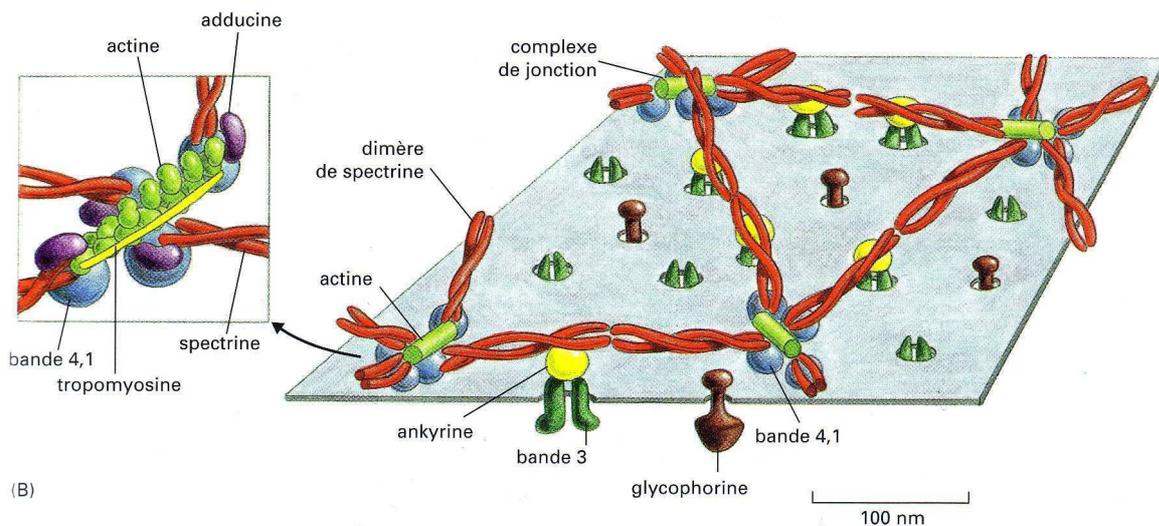


Figure 1_21: Représentation schématique du cytosquelette d'un globule rouge et de ses liaisons avec la membrane plasmique (tiré de Alberts et al., 1994).

Les érythrocytes ont beaucoup été étudiés et il est connu depuis plus de 50 ans qu'un certain nombre d'agents chimiques et physiques peuvent modifier la forme habituellement discoïde des globules rouges, ceci à volume et surface constants (Ponder, 1948). Ces agents (teneur en sels, variation du pH, quantité de cholestérol dans la membrane, ...) peuvent provoquer l'apparition d'une série de formes crénelées, appelées échinocytes, formes caractérisées par des spicules (sorte de pics) d'environ un micron, ou alternativement l'apparition de formes concaves, appelées stomatocytes. On parle ainsi de la séquence stomatocyte-discoïde-échinocyte qui est une séquence universelle au sens où les formes observées et leur ordre d'apparition ne dépend pas de l'agent utilisé.

Il est aujourd'hui possible de reproduire théoriquement la séquence qui mène une hématie de la forme stomatocyte à la forme discoïde et enfin à la forme échinocyte ceci en faisant varier seulement un paramètre : la différence d'aires relaxées entre les deux feuilletts de la bicouche phospholipidique, $\Delta A_0 = A_0^{\text{ext}} - A_0^{\text{int}}$ (Lim et al., 2002). Dans leur modèle, les auteurs prennent en compte les propriétés de la membrane composite, décrite comme

l'association bi-dimensionnelle du réseau de spectrine élastique ancré dans la membrane plasmique. Ainsi, l'énergie libre totale de cette membrane composite est la somme de l'énergie libre de la bicouche lipidique (calculée dans le cadre de la théorie ADE, c'est-à-dire avec courbure spontanée et le terme élastique global qui traduit la possibilité pour chaque feuillet d'acquérir une aire variable différente de son aire relaxée) et de l'énergie libre du cytosquelette qui est une énergie élastique qui s'exprime en fonction des modules élastiques d'étirement et de cisaillement du cytosquelette.

Pour trouver les formes d'équilibre (configurations localement stables) d'hématies en fonction d'un paramètre, les auteurs ont cherché le ou les minimums de l'énergie libre totale de cette membrane composite en fixant ce paramètre, en l'occurrence ici la différence d'aires relaxées. Ainsi, la Figure 1_22 montre une séquence de formes calculées en augmentant ΔA_0 d'une valeur initiale négative (forme obtenue de stomatocyte) à des valeurs positives supérieures à 1 (formes obtenues d'échinocytes), tout en gardant toutes les autres caractéristiques de la membrane (aire, volume, modules élastiques d'étirement et de cisaillement, ...) fixes. On voit bien sur cette figure que la seule variation de ΔA_0 permet de retrouver théoriquement la séquence stomatocyte-discocyte-échinocyte, les formes théoriques calculées (à droite) étant très proches des formes observées expérimentalement dans diverses conditions (à gauche).

Il apparaît une analogie entre les résultats obtenus, d'une part, avec ce modèle de membrane composite et, d'autre part, avec l'hypothèse de Sheetz and Singer (1974) d'un couplage entre les feuillets. En effet, ce modèle de couplage (bilayer-couple hypothesis) a pour la première fois introduit la différence d'aires relaxées comme un paramètre dont les variations permettent de retrouver différentes morphologies. Néanmoins ce couplage entre les couches à lui seul ne permet pas de retrouver la transition discocyte-échinocyte parce qu'il ne prend pas en compte l'énergie élastique du cytosquelette sous-jacent. Cette énergie élastique du cytosquelette de spectrine a été mise en avant et prise en compte dès les études d'Iglič (1997) et de Waugh (1996).

1.9 Membranes lipidiques associées à des polymères

Pour mimer le comportement de cellules vivantes comme, par exemple, des globules rouges, il apparaît clair que des vésicules remplies d'une solution aqueuse sont de portée limitée. En effet, pour ce faire, il semble nécessaire d'introduire dans une vésicule un réseau

de polymères qui puisse structurer la membrane, par analogie au cytosquelette, et lui conférer des propriétés viscoélastiques proches de celles observées dans les cellules qui nous intéressent.

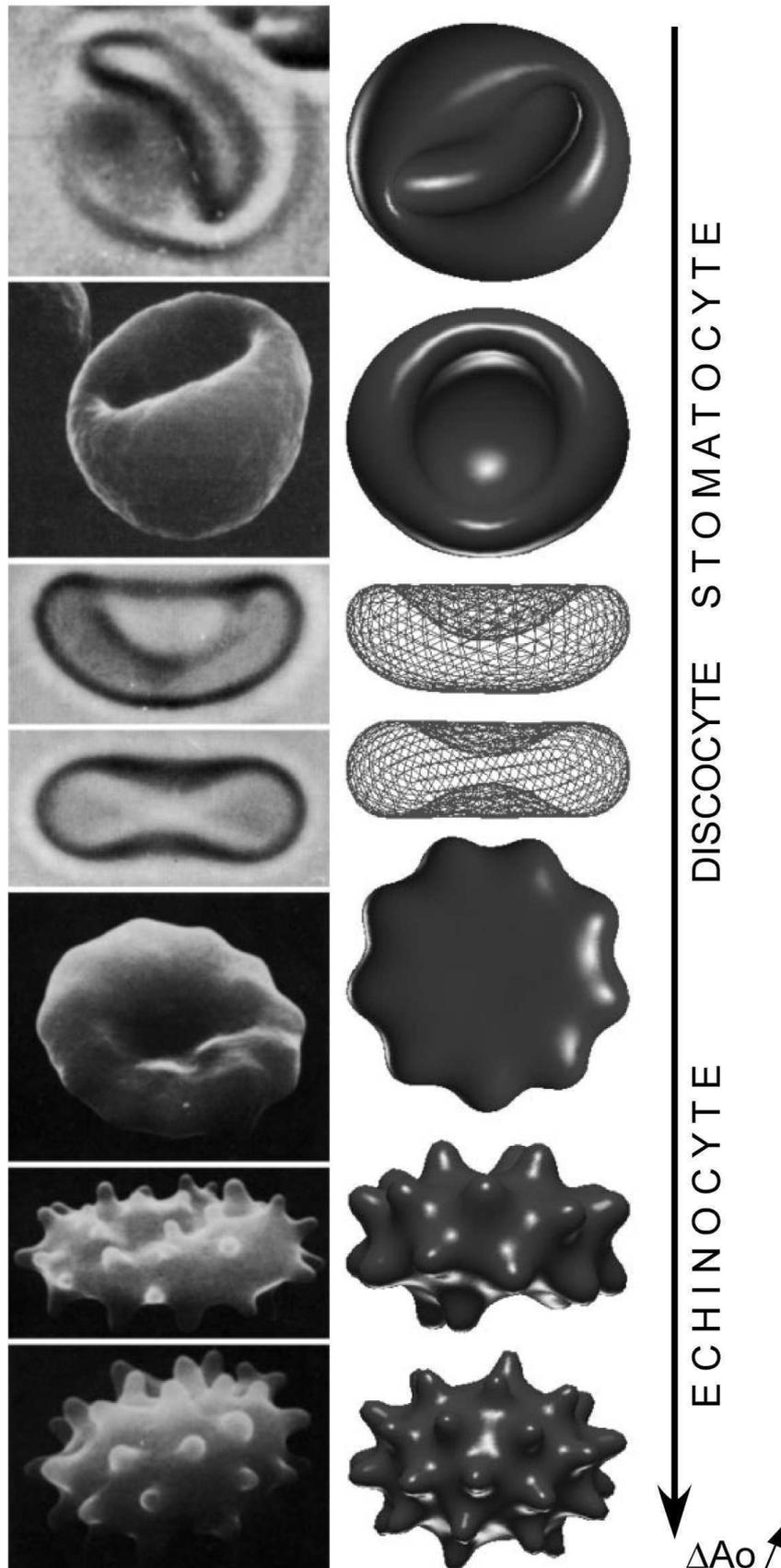


Figure 1_22: Correspondance entre morphologies de globules rouges observées en laboratoire dans des conditions expérimentales variées et les formes calculées théoriquement en faisant varier un seul paramètre (la différence d'aires relaxées) dans le cadre du modèle de Lim et al. (2002) avec comme volume réduit $v_0 = 0,950$. Ce modèle considère la membrane d'un globule rouge comme une membrane plasmique supportée par un cytosquelette. Il permet de retrouver la séquence stomatocyte-discocyte-échinocyte en faisant varier ΔA_0 (tiré de Lim et al., 2002).

Ainsi différents travaux rapportent la fonctionnalisation de vésicules avec des chaînes polymères. Dans une étude de 1984, Gaub et al. préparent des vésicules dont la bicouche contient une fraction de lipides butadiène polymérisés. Plus récemment, des réseaux auto-assemblés de filaments d'actine ont été attachés à l'extérieur de la surface de vésicules géantes unilamellaires et le comportement viscoélastique de cette membrane composite a clairement été démontré (Helfer et al., 2001). Malheureusement, ce système ne permet pas d'accéder au feuillet lipidique externe. Un moyen de contourner cet inconvénient est d'introduire un réseau polymère dans le volume intérieur de la vésicule.

Ainsi, des réseaux d'actine réticulés par des protéines de réticulation naturelles comme l' α -actinine et la filamine ont été formés dans des vésicules géantes (Häckl et al., 1998 ; Boulbitch et al., 2000 ; Limozin and Sackmann, 2002). Selon la protéine de réticulation utilisée, les concentrations relatives d'actine et de protéine de réticulation et la taille de la vésicule, les réseaux d'actine montrent différentes morphologies comme des « toiles d'araignée », des anneaux parfois enroulés, des fibrilles (Fig. 1_23). Dans ces expériences, le réseau d'actine ne supporte pas toujours la membrane mais peut la déformer (Fig. 1_23_B, C).

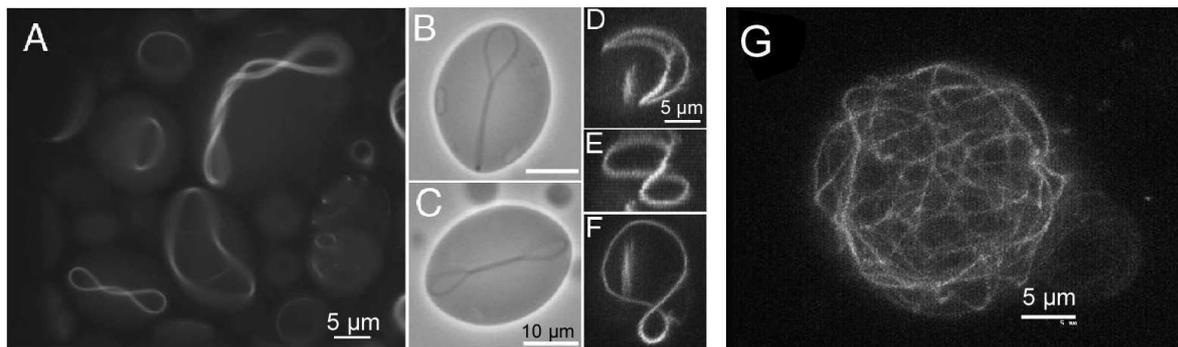


Figure 1_23: A, B, C, D, E, F) Enroulements et fibrilles de filaments d'actine. G) Réseau d'actine en toile d'araignée (tiré de Limozin and Sackmann, 2002).

Deux méthodes ont été proposées pour obtenir un réseau flexible réticulé de poly(NIPAM) (N-isopropylacrylamide) attaché au feuillet interne de liposomes (Kazalov et al., 2002 ; Stauch et al., 2002). Les auteurs rapportent la formation de vésicules dont le volume interne est complètement rempli par le réseau et de vésicules supportées par un réseau bi-dimensionnel. Ces études sont malheureusement limitées à des liposomes de tailles inférieures au micron si bien que l'observation avec un microscope optique est impossible.

Jusqu'à maintenant, j'ai introduit les notions utiles au travail de dégonflement de liposomes dont le milieu interne est rempli d'un gel d'agarose. Dans la suite, j'introduis mon travail consistant à appliquer des forces hydrodynamiques sur des vésicules sensées pouvoir adhérer spécifiquement à un substrat recouvert de lectines.

1.10 Vésicules soumises à un flux hydrodynamique

Dans un milieu liquide, le mouvement d'objets de tailles de l'ordre du micron dépend des forces visqueuses. Le transport de quantité de mouvement par convection (turbulence, tourbillons) ne joue pas de rôle (Guyon et al., 2001). Pour s'en convaincre, il suffit d'estimer le nombre de Reynolds de l'écoulement correspondant. En changeant de référentiel, le mouvement d'un objet dans un liquide au repos peut être vu comme l'écoulement de ce liquide autour de cet objet fixe. Ainsi, le nombre de Reynolds sera égal à :

$$\text{Re} = \frac{\text{flux}_{\text{convectif}} \text{ de la quantité de mouvement}}{\text{flux}_{\text{diffusif}} \text{ de la quantité de mouvement}} = \frac{\rho U^2}{\eta U / L} = \frac{\rho U L}{\eta}$$

où ρ et η sont, respectivement, la densité (en kg/m^3) et la viscosité dynamique (en $\text{Pa}\cdot\text{s}$) du liquide, U est une vitesse caractéristique de l'écoulement (c'est-à-dire la vitesse de déplacement de l'objet), et L est une taille caractéristique de l'objet.

Dans le cas de cellules ou d'objets de tailles de l'ordre de $1\text{-}100\ \mu\text{m}$ en mouvement dans un liquide aqueux au repos, le nombre de Reynolds est très inférieur à 1, ce qui signifie que les forces visqueuses (et le transport diffusif associé) sont dominantes. L'écoulement est donc très stable, par opposition aux écoulements turbulents observés lorsque le nombre de Reynolds est supérieur à 200.

Dans toutes les expériences sous flux réalisées lors de cette thèse, nous sommes dans des conditions donnant des faibles nombres de Reynolds et l'équation de Navier-Stokes du mouvement d'un fluide se simplifie alors et s'écrit pour un fluide en régime stationnaire :

$$\eta \Delta \mathbf{V} - \nabla p + \mathbf{f}_{\text{ext}} = \mathbf{0}$$

où \mathbf{V} est le champ de vitesse de l'écoulement, p est la pression du fluide et \mathbf{f}_{ext} sont les forces extérieures appliquées au fluide.

La condition d'incompressibilité du fluide s'écrit :

$$\text{div } \mathbf{V} = 0$$

Les études auxquelles je fais référence dans la suite s'inscrivent toutes dans un cadre dans lequel ces équations sont vérifiées.

Comme nous l'avons déjà vu, les vésicules sont des objets qui se déforment en réponse aux contraintes extérieures. Pour comprendre leur mouvement quand elles sont soumises à un écoulement hydrodynamique, nous allons d'abord nous intéresser au mouvement de sphères rigides sous flux. Dans un second temps, nous verrons l'effet de la déformabilité des liposomes dans le comportement sous flux.

1.10.1 Mouvement de sphères rigides sous écoulement et près d'un substrat

Le cas du mouvement d'une sphère de rayon R se déplaçant à une hauteur h d'un substrat (distance du bas de la sphère au substrat) et soumise à un flux de cisaillement a été étudié par Goldman et al. (1967). Les auteurs ont obtenu une solution exacte des équations de Stokes pour les vitesses de translation et de rotation. Dans le cas d'une sphère très proche du substrat ($h/R \ll 1$), ces vitesses peuvent alors s'écrire sous la forme :

$$V/G = 0.7431 (h + R) / [0.6376 - 0.200 \ln(h/R)]$$

$$2\omega/G = 0.8436 / [0.6376 - 0.200 \ln(h/R)]$$

où V et ω sont les vitesses de translation (en $\mu\text{m/s}$) et de rotation (en rad/s) de la sphère respectivement, et G est le taux de cisaillement (en s^{-1}).

Ces équations nous permettent alors d'écrire :

$$V/G = (h + R) / [0.8580 - 0.2691 \ln(h/R)]$$

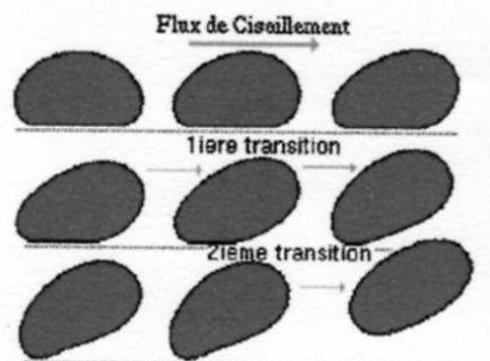
$$\text{et } \omega R/V = 0.5676 / (1 + h/R).$$

$\omega R/V$ est le ratio de la vitesse de rotation (en $\mu\text{m/s}$) sur la vitesse de translation (en $\mu\text{m/s}$).

1.10.2 Mouvement d'objets déformables sous écoulement et au contact d'un substrat

Des calculs numériques en deux dimensions concernant le mouvement d'une vésicule en adhésion non spécifique avec un substrat et soumise à un écoulement de cisaillement ont été réalisés par Cantat et Misbah (1999). Dans cette simulation, la vésicule en adhésion faible avec le substrat a initialement une forme symétrique par rapport à un axe perpendiculaire au substrat et passant par son centre. Elle est ensuite soumise à un flux de cisaillement dont la contrainte augmente progressivement. On observe que la vésicule se déforme (brisure de symétrie), puis sa longueur d'adhésion avec le substrat décroît (1^{ère} transition), et finalement pour un taux de cisaillement critique, elle finit par décoller complètement du substrat (2^{ième} transition ; Fig. 1_24).

Figure 1_24:
Calculs théoriques 2D de la morphologie d'une vésicule soumise à un flux de cisaillement dont la contrainte augmente (tiré de Cantat et Misbah, 1999).



Ces calculs montrent ainsi l'existence d'une force de portance qui s'exerce sur la vésicule et permet son décollement du substrat. Des simulations numériques tridimensionnelles confirment l'apparition d'une force de portance et l'existence d'un taux de cisaillement critique pour lequel les vésicules en adhésion (et sans poids) se détachent du substrat (Sukumaran and Seifert, 2001). Ce comportement de décollage sous flux n'est possible que grâce, d'une part, à la déformabilité des objets comme les vésicules (contrairement au cas des sphères rigides dont nous avons parlé plus haut) et, d'autre part, à la présence du substrat.

D'un point de vue expérimental, Abkarian et al. (2002) ont observé de côté le mouvement et la morphologie de vésicules partiellement dégonflées, en adhésion non spécifique à un substrat et soumises à un flux de cisaillement de contrainte de plus en plus grande. Ces expériences valident qualitativement les simulations numériques précédentes en mettant en évidence l'apparition d'une brisure de symétrie du contour vésiculaire pour des taux de cisaillement inférieurs à un taux de cisaillement critique, et l'existence d'une force de portance hydrodynamique qui provoque le décollage de la vésicule au-dessus de ce taux critique (Fig. 1_25). Cette force de portance s'oppose aux forces d'adhésion et de gravité. De plus, un mouvement de chenille de char de la membrane est observé.

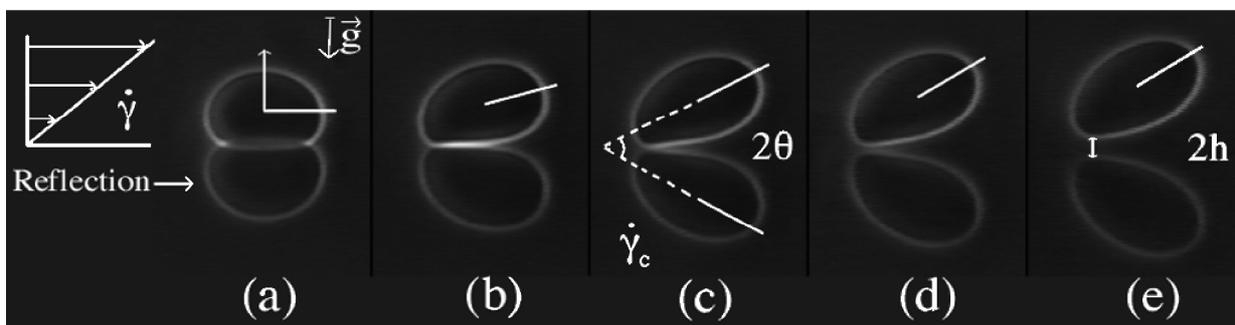


Figure 1_25: Observation de côté d'une vésicule initialement au repos sur un substrat (a), puis soumise à un taux de cisaillement de plus en plus grand. La vésicule finit par décoller au-dessus d'un taux critique d'environ 1 s^{-1} (tiré de Abkarian et al., 2002).

Lorsque les vésicules se déplacent dans le sens du flux tout en restant très proches avec le substrat (taux de cisaillement inférieur au taux critique), elles ont une forme légèrement asymétrique. Dans ces conditions, elles roulent et glissent simultanément le long du substrat avec autant de glissement que de roulement ($\omega R/V = 0,5$ en moyenne sur deux vésicules). De plus, dans ces conditions, la courbe expérimentale V/G fonction de R semble bien décrite par le modèle de Goldman et al. (1967) des sphères rigides (Abkarian et al., 2002).

1.11 L'adhésion spécifique à un substrat

L'adhésion non spécifique de vésicules à un substrat, par exemple de verre, est assez faible. Par exemple, Rädler et al. (1995) ont obtenu, à l'aide de mesures d'angles de contact, pour des vésicules adhérant à une surface de verre, $W_{adh} = 4.10^{-8} \text{ J.m}^{-2}$, comparé à $2.10^{-5} \text{ J.m}^{-2}$ pour des cellules *Dictyostelium discoideum* sur la même surface (Simson et al., 1998). L'interaction globale entre une bicouche lipidique et un substrat solide résulte de la superposition d'un potentiel répulsif à courte portée et d'un potentiel attractif à longue portée, essentiellement de type van der Waals (Evans, 1995).

L'adhésion spécifique de cellules avec d'autres cellules ou la matrice extra-cellulaire est un mécanisme primordial dans de nombreux processus biologiques comme la réponse inflammatoire ou la morphogenèse. L'adhésion joue aussi un rôle dans la formation de métastases cancéreuses. C'est pourquoi la reconstitution in vitro de modèles d'adhésion spécifique entre un objet déformable, comme par exemple une vésicule contenant des molécules d'adhésion, et une surface fonctionnalisée présente un intérêt pour finalement mieux comprendre l'adhésion de systèmes plus complexes.

Pincet et al. (2001) ont mis en évidence la spécificité d'un lien Lewis^x-Lewis^x en mesurant l'adhésion entre deux vésicules géantes fonctionnalisées avec ce glycolipide. La technique utilisée pour mesurer l'adhésion consiste à mettre en contact deux vésicules à l'aide de l'aspiration créée dans des micropipettes (Fig. 1_26). La mesure de l'angle de contact entre les vésicules permet de remonter à l'énergie d'adhésion (de l'ordre de 10^{-5} J/m^2). Il est à noter que le glycolipide possède un espaceur entre la tête sucre et les chaînes hydrocarbonées.

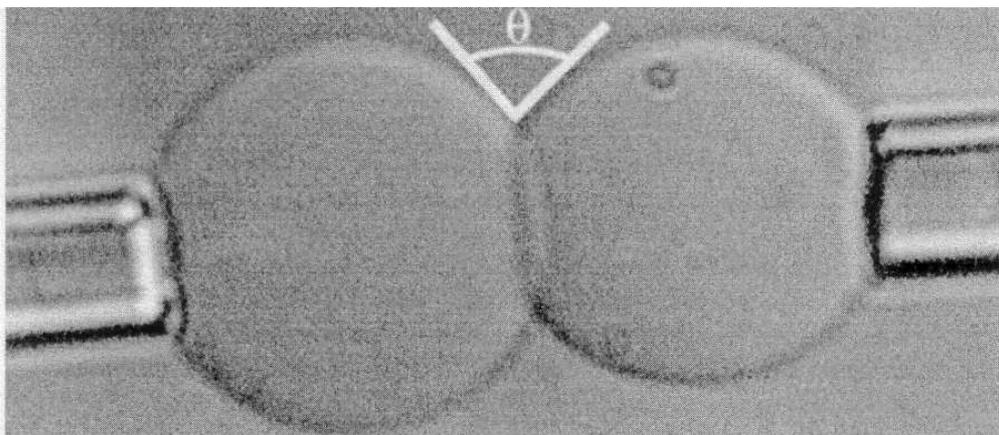


Figure 1_26: Deux vésicules maintenues aspirées dans deux micropipettes et mises en contact. Une des deux vésicules est maintenue avec une faible pression de manière à lui laisser la possibilité de se déformer (tiré de Pincet et al., 2001). La mesure de l'angle de contact permet de remonter à l'énergie d'adhésion entre les deux vésicules.

Boulbitch et al. (2001) rapportent la mesure des cinétiques d'adhésion entre une vésicule géante fonctionnalisée avec un ligand RGD (qui est spécifiquement reconnu par l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ des plaquettes sanguines) et une surface recouverte de cette intégrine. Les vésicules contiennent aussi des phospholipides à tête PEG (polyéthylène glycol) de manière à supprimer l'adhésion de type van der Waals non spécifique. L'adhésion est observée en utilisant la technique microscopique RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy ; Fig. 1_27). L'énergie d'adhésion, qui est fonction des concentrations en PEG et en ligands RGD, est de l'ordre de 10^{-6} J/m^2 (Guttenberg et al., 2001). La transition entre l'état de faible adhérence non spécifique (contrôlé par la gravité) et l'état de forte adhérence spécifique est du premier ordre. En utilisant la même technique RICM, des études ont trouvé le même ordre de grandeur pour l'énergie d'adhésion spécifique de vésicules géantes fonctionnalisées avec une glycoprotéine, la csA de *Dictyostelium discoideum*, à une surface recouverte de la même glycoprotéine (Kloboucek et al., 1999).

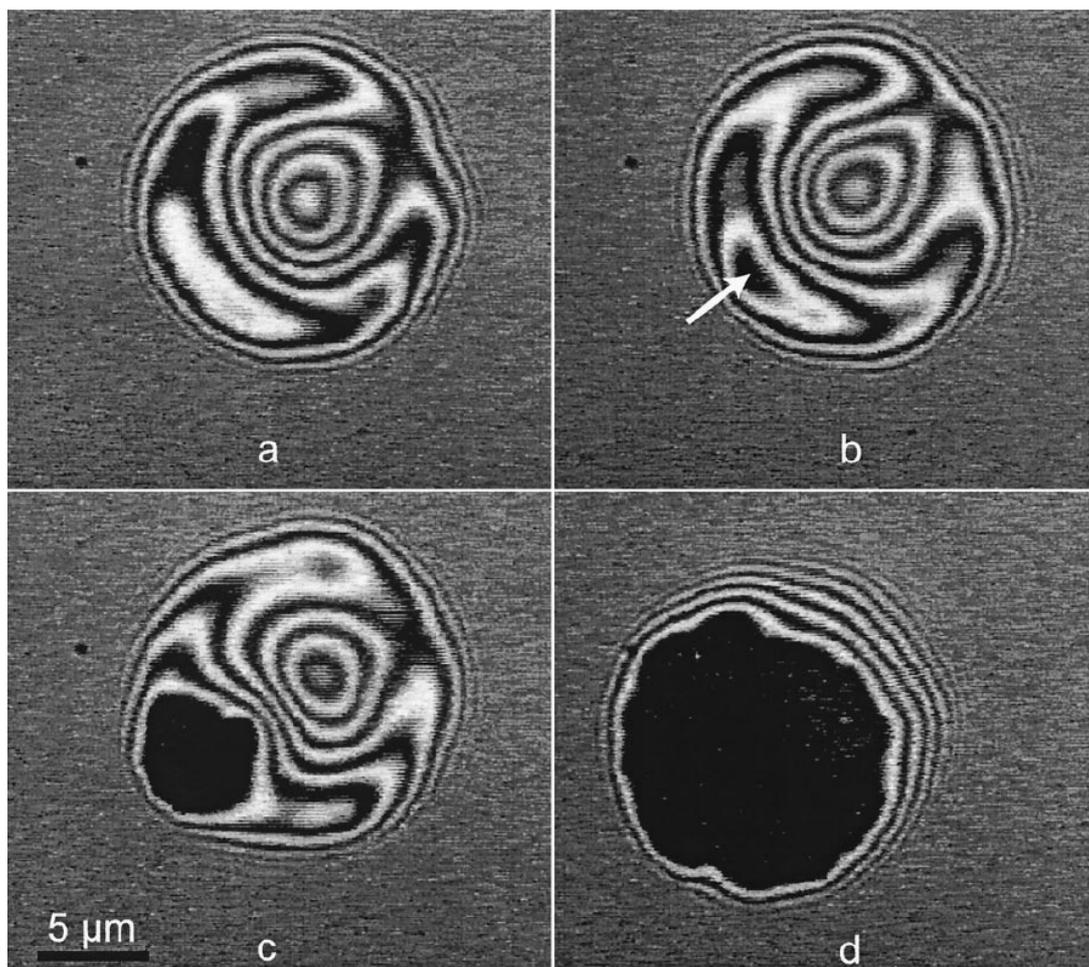


Figure 1_27: Aire d'adhésion d'une vésicule à un substrat visualisée par RICM. En a), la vésicule repose juste sur le substrat, l'adhésion est non spécifique. En b) une région d'adhésion forte spécifique est nucléée (flèche). En c et d), la région d'adhésion forte et spécifique vésicule-substrat augmente (tiré de Boulbitch et al., 2001).

Hildebrand et al. (2002) mettent en évidence l'adhésion entre des grandes vésicules (diamètres d'environ 95 nm) fonctionnalisées avec un glycolipide (le mannopyranoside) et une surface de quartz recouverte de la lectine Concanavalline A qui reconnaît spécifiquement ce lipide. Pour détecter l'adhésion, les auteurs laissent les vésicules en contact avec la surface pendant 3 heures et repèrent la variation de fréquence d'une microbalance à cristal de quartz (QCM). Ce système biomimétique est intéressant car l'adhésion lectine-carbohydre joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques (inflammation, signalisation cellulaire, interactions entre cellules du système immunitaire, ...). La même technique QCM avec des vésicules biotinylées de tailles similaires (100 nm) rentrant en contact avec une surface recouverte de streptavidine mène aux mêmes observations qualitatives. De plus, ces auteurs utilisent un microscope de force à balayage pour visualiser la morphologie des vésicules qui sont de plus en plus aplaties sur le substrat lorsque la concentration de biotine dans la membrane augmente (Pignataro et al., 2000).

Toutes les études mentionnées juste au-dessus correspondent à la fabrication de systèmes d'adhésion spécifique entre des vésicules grandes et géantes et des substrats fonctionnalisés. Dans tous ces travaux, les vésicules sont soumises à la gravité et aux forces attractives (spécifiques ou non spécifiques) et répulsives dues à la présence du substrat. En laissant les vésicules sédimenter suffisamment longtemps, on se retrouve donc dans des conditions d'équilibre. Le but d'études sur de tels systèmes est de prédire dans quelles conditions l'adhésion entre la vésicule et le substrat est possible, de calculer l'énergie d'adhésion, et de mesurer la surface de contact en fonction des propriétés des protéines d'adhésion et des propriétés de la membrane. Les études prenant en compte, en plus de ces forces, des forces de cisaillement hydrodynamique sont beaucoup plus rares. La présence d'un flux permet de simuler, par exemple, l'adhésion de cellules sanguines (leucocytes) aux parois des vaisseaux sanguins lors de la réponse inflammatoire, ou encore le détachement de cellules endothéliales. Dans ce type d'expériences, le but est de décrire l'attachement et le détachement d'objets adhésifs sous flux.

Wattenbarger et al. (1990) rapportent une telle expérience dans laquelle des vésicules géantes contenant des glycophorines sont soumises à un flux hydrodynamique dans une chambre à flux dont la surface inférieure est un substrat de verre sur laquelle des lectines WGA (Wheat Germ Agglutinin), qui reconnaissent spécifiquement la glycophorine, sont liées de manière covalente. Les auteurs observent d'abord les vésicules sous flux se rapprocher du substrat. Lorsqu'elles se situent à une distance inférieure à un micron du substrat, elles peuvent soit adhérer de manière définitive au substrat, soit alterner entre mouvements avec le

flux et arrêts. Les auteurs introduisent donc une « probabilité d'adhésion définitive » qui est l'inverse du nombre de contacts adhésifs (arrêts) que le liposome fait avant d'adhérer de manière permanente au substrat. Ils observent que cette probabilité décroît (présence de plus d'arrêts momentanés avant adhésion ferme) lorsque la concentration de glycophorine dans les vésicules diminue et lorsque le taux de cisaillement augmente, en accord semi-quantitatif avec un modèle théorique d'adhésion cellulaire dynamique (Hammer and Lauffenburger, 1987).

1.12 Objectif du travail de thèse, premier volet

Dans ce premier volet de ma thèse, mon objectif général fut de reconstituer deux systèmes biomimétiques : deux types de liposomes géants comportant chacun une fonctionnalisation différente (présence d'un gel dans le volume interne dans un premier temps et insertion de glycolipides dans la membrane dans un deuxième temps). L'observation du comportement de ces systèmes artificiels sous différentes contraintes est sensé apporter des éclairages quant au comportement de cellules soumise aux mêmes contraintes.

Dans un premier travail, ayant remarqué l'apparition de formes originales rappelant celles d'échinocytes lors d'expériences préliminaires de dégonflement de liposomes remplis de gel d'agarose, nous nous sommes fixés pour objectifs 1) de fabriquer un dispositif permettant de dégonfler des vésicules de manière contrôlée et de les observer tout au long de leur dégonflement, 2) de déterminer les conditions d'obtention de ces formes en fonction des paramètres ajustables par l'expérimentateur (valeur du choc osmotique, concentration de gel, ...), 3) de quantifier les cinétiques de dégonflement menant à leur obtention ainsi que la morphologie de ces objets, et enfin 4) d'établir un modèle expliquant cette morphogénèse.

Pour ce faire, j'ai donc développé une chambre de dégonflement permettant d'observer les liposomes sous choc osmotique dans de bonnes conditions optiques et en limitant les mouvements de convection. Après avoir réalisé des expériences de dégonflement en utilisant différentes concentrations de gel, j'ai quantifié les volumes des liposomes et en ai déduit les cinétiques de dégonflement ainsi que la pression élastique exercée par les liposomes remplis de gel.

Dans un second temps, notre objectif était de fonctionnaliser des liposomes géants à l'aide de glycolipides pour mimer l'adhérence cellulaire à un substrat recouvert d'une lectine servant de ligand spécifique des glycolipides.

II Matériels et Méthodes

2.1 Fabrication des liposomes

Deux méthodes sont largement utilisées pour fabriquer des liposomes : l'électroformation et la méthode de formation spontanée. J'ai utilisé essentiellement la méthode d'électroformation et à quelques occasions la deuxième. Voyons en quoi elles consistent et quelles sont leurs avantages et leurs inconvénients.

2.1.1 Les lipides utilisés

Les phospholipides utilisés dans nos manipulations sont le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou DOPC ¹ (Fig. 1_2_C) et le 1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou SOPC ² (Fig. 1_2_C). Le DOPC est un lipide synthétique, non chargé (zwitterionique) de température de fusion égale à -22°C . Le SOPC est un lipide également non chargé, de température de fusion égale à 18°C . Dans quelques expériences, du cholestérol³ a été utilisé pour modérer la fluidité des membranes. Dans tous les cas, le produit sec est dissout dans une solution de chloroforme/méthanol en proportion volumique 9:1. On prépare deux solutions : une solution mère concentrée (10 mg/mL) et une solution à la concentration de travail, typiquement 1,5 mg/mL. Ces deux solutions sont conservées au congélateur ($-20/-30^{\circ}\text{C}$) idéalement sous atmosphère d'argon. La solution mère sert de stock et permet de refaire une nouvelle solution à 1,5 mg/mL lorsque les lipides de la solution de travail semblent détériorés du fait des sorties fréquentes du congélateur (les cycles de congélation-décongélation sont toujours néfastes). Les solutions peuvent se conserver au congélateur sur une période de temps de l'ordre du mois.

Pour les expériences d'adhésion spécifique à un substrat (recouvert de lectines), deux glycolipides ont été testés : le lactosyl-céramide⁴ et le GM3 (céramide)⁵ (Fig. 2_1). Le LacCer est dilué dans un mélange de chloroforme/méthanol en proportion volumique 3:1, ou alternativement dans du méthanol, à la concentration de 0,5 mg/mL. Le GM3 est dilué dans

¹ DOPC : Sigma, réf. P6354

² SOPC : Avanti Polar Lipids, revendeur Cogem, réf. 850 467

³ cholestérol : Avanti Polar Lipids, revendeur Cogem, réf. 700 000

⁴ lactosyl-céramide bovin : abrégé LacCer, acheté chez CALBIOCHEM, réf. 427572 (revendeur Merck Eurolab)

⁵ gentiment donné par Yongmin Zhang de l'Institut Curie

un mélange de chloroforme/méthanol en proportion volumique 2:1, à la concentration de 0,5-1 mg/mL.

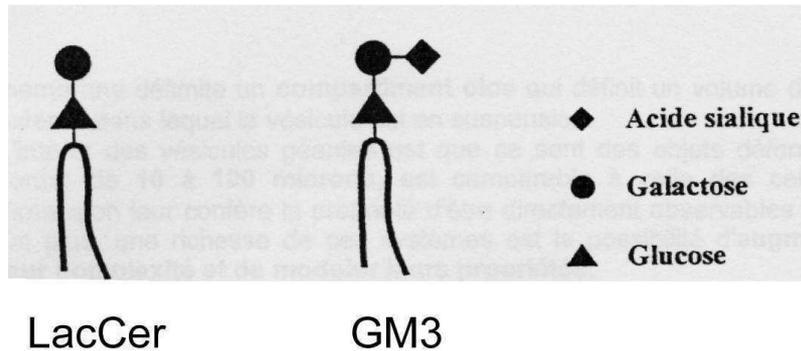


Figure 2_1:
Représentation schématique des deux glycolipides : LacCer et GM3.

2.1.2 La méthode d'électroformation

Le principe de la méthode d'électroformation est l'application d'une tension électrique alternative entre deux électrodes planes sur lesquelles sont déposés les lipides désirés pour former les vésicules. Ces deux surfaces sont séparées par un volume rempli d'une solution aqueuse (milieu interne des futures vésicules). L'application du champ électrique alternatif permet l'hydratation du film de lipides et la croissance des vésicules. Ce procédé, proposé par Angelova et al. dans les années 80 (Angelova et al., 1992) fournit essentiellement des vésicules unilamellaires sphériques de tailles comprises entre 10 et 100 μm (Mathivet, 1996).

2.1.2.1 Les lames ITO

Les deux électrodes sont deux lames carrées (2,5 x 2,5 cm) de verre recouvertes d'un film conducteur d'ITO⁶ (pour Indium Tin Oxyde, ou oxyde d'étain dopé à l'indium). Ce film d'ITO, de dimensions 2 x 1 cm et de résistivité 10 Ω , est déposé en couche mince (2000 \AA) et a l'avantage d'être transparent à la lumière visible. Les lames peuvent être nettoyées et frottées sans risque de détériorer ce film.

Un contact électrique permanent est réalisé sur la face conductrice de chacune des lames, par collage à la colle d'argent d'un fil de cuivre multibrin dénudé sur environ 5 mm. Le contact est alors recouvert d'un joint silicone⁷ pour le protéger du milieu aqueux.

Avant chaque dépôt de lipides sur ces lames, elles sont nettoyées à l'aide d'une solution diluée de tensioactif anionique⁸, rincées abondamment à l'eau bidistillée, frottées

⁶ achetées chez Thomson LCD

⁷ joint silicone en CAF4 de chez Rhodia

⁸ solution de 5 % de Decon 90 de chez Prolabo

avec de l'éthanol à 95 % et enfin à nouveau rincées abondamment à l'eau bidistillée. Les lames sont alors séchées sous flux d'argon pur.

2.1.2.2 Le dépôt de lipides

En sortant la solution lipidique de travail du congélateur, éviter la condensation dans le flacon.

La solution lipidique est déposée sur chaque surface d'ITO à l'aide d'une seringue en verre de 10 μ L munie d'une aiguille métallique (Fig. 2_2). 10 μ L sont déposés de manière linéaire et continue (typiquement un serpentín) en cherchant à maximiser la surface recouverte par les lipides et en évitant d'intercepter une région déjà recouverte. Le chloroforme et le méthanol s'évaporent très vite et le dépôt est donc vite sec.

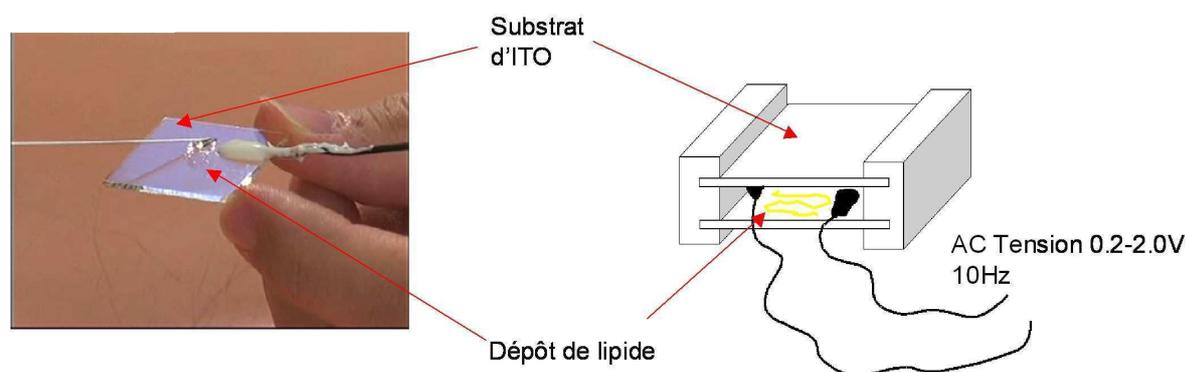


Figure 2_2: Dépôt de la solution lipidique sur une surface d'ITO à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille métallique. Les faces conductrices des plaques sont placées en regard l'une de l'autre et sont emboîtées dans deux supports en téflon.

Les lames recouvertes de lipides sont alors placées sous vide primaire pendant au moins deux heures pour éliminer complètement le solvant.

2.1.2.3 La chambre d'électroformation

Les lames servant d'électrodes étant transparentes, cela permet de suivre l'électroformation en temps réel.

Les faces conductrices des plaques ITO (faces sur lesquelles se trouvent les phospholipides) sont placées en regard l'une de l'autre et sont emboîtées dans deux supports en téflon (Fig. 2_2). La distance entre les deux surfaces parallèles est alors de 1 mm.

On scelle ensuite la chambre à l'aide d'une pâte⁹ en laissant deux trous sur le côté sans fil (Fig. 2_3), un pour insérer l'aiguille d'une seringue qui va servir à injecter la solution aqueuse, et l'autre pour permettre la sortie de l'air. On branche alors les électrodes au générateur alternatif à une fréquence de 10 Hz et une amplitude de 0,2-0,3 V. On injecte lentement la solution aqueuse dans la chambre. Une fois la chambre complètement remplie de la solution (ne pas laisser de bulle d'air), les deux trous sont fermés avec la pâte de scellement. La chambre doit alors être étanche tout le long de l'électroformation pour éviter la fuite ou l'évaporation de la solution.



Figure 2_3: Injection d'une solution aqueuse de sucrose dans la chambre d'électroformation en partie scellée.

2.1.2.4 La croissance des vésicules

Dès les premières minutes suivant l'injection, des structures circulaires de quelques microns apparaissent. Ces structures vibrent à la fréquence imposée de 10 Hz et croissent avec la montée progressive en tension grâce à des phénomènes de fusion entre vésicules (Fig. 2_4).

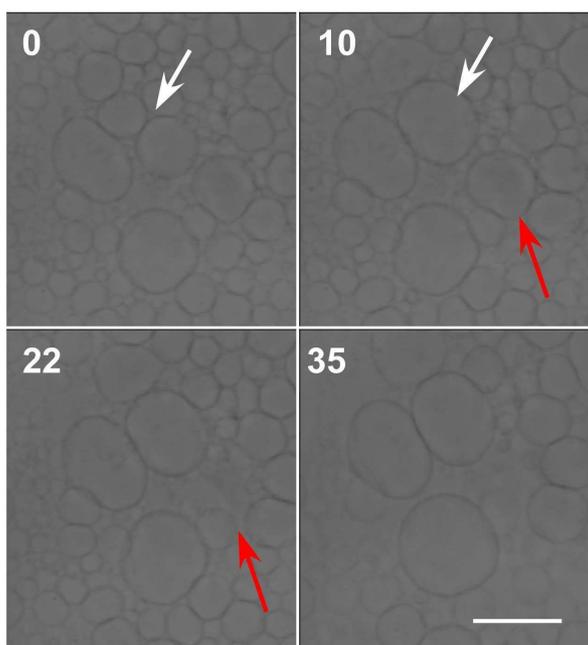


Figure 2_4: Les vésicules croissent avec la montée progressive en tension grâce à des phénomènes de fusion. Images en contraste de phase. Le temps est indiqué en secondes. De 0 à 10 sec, la flèche blanche indique la fusion de deux vésicules. De 10 à 22 sec, une vésicule a éclaté (indiquée par la flèche rouge). La barre vaut 20 μm .

⁹ pâte de scellement pour tube d'hématocrite, CRITOSEAL, achetée chez Fischer Scientific

L'augmentation de la tension va permettre de provoquer l'apparition d'un maximum d'évènements de fusion. Le réglage de la rampe de montée en tension est empirique et se fait en fonction des observations dans la chambre. Si l'expérimentateur observe des fusions, il peut laisser constante la tension. Au bout d'un certain temps, les fusions sont de moins en moins fréquentes et il faut alors passer à un palier de tension supérieur. Au contraire, si on observe plutôt des éclatements de vésicules, on aura tendance à diminuer légèrement la tension appliquée pour stopper les éclatements. Typiquement, dans le cas de vésicules dans une solution aqueuse sucrée (par exemple, 50 mM de sucrose), les paliers de tension et la durée des paliers sont les suivants : on passe de 0,2 V à 0,5 V en un quart d'heure, puis de 0,5 à 1 V en une demi-heure, puis on stabilise la tension autour de 1,2-1,3 V durant deux à trois heures.

Lorsqu'à la fin de l'électroformation, les vésicules, de forme sphérique, ont atteint des tailles comprises entre 10 et 100 μm , elles restent attachées au réservoir de lipides sur la surface par un cou lipidique. On diminue alors, pendant les 10-20 dernières minutes, la fréquence du champ alternatif à environ 4 Hz et la tension à environ 0,3-0,6 V. Cette fréquence plus faible permet le détachement des vésicules de la surface.

L'électroformation étant terminée, on prélève lentement la solution de la chambre qui contient ces nombreuses vésicules géantes en l'aspirant à l'aide d'une seringue en plastique munie d'une aiguille large et à grand biseau¹⁰ pour minimiser le cisaillement des vésicules.

On transfère doucement les vésicules dans un eppendorf (1,5 mL). Il est important d'utiliser un récipient en plastique car les vésicules peuvent adhérer de manière non spécifique à du verre, ce qui risque de les faire éclater. On conserve alors les vésicules au réfrigérateur à 4°C pendant typiquement une semaine.

2.1.3 La méthode de formation spontanée

Les dépôts de lipides (30 μL de la solution lipidique de travail) sont réalisés sur une surface de téflon rayée (à l'aide d'un cutter) pour donner un aspect strié à la surface.

Le substrat de téflon est ensuite placé sous vide primaire pendant deux heures. Puis ce substrat recouvert de lipides est immergé dans 10 mL de la solution aqueuse désirée pour constituer le milieu interne des vésicules.

Le tout est laissé au repos pour une incubation d'une nuit à 37°C.

¹⁰ aiguilles Terumo 18G (1,2 mm x 40 mm), réf. NN-1838R

Le lendemain, on observe des filaments blanchâtres flottant dans la solution : ce sont des amas de vésicules.

Cette méthode est donc très simple. Néanmoins, la plupart des vésicules formées sont multilamellaires, c'est-à-dire qu'elles possèdent plusieurs membranes disposées en pelures d'oignons. Les tailles typiques obtenues sont de 5 à 30 μm de diamètre. Elles sont donc aussi plus petites que les vésicules obtenues par électroformation.

2.1.4 Liposomes de DOPC avec solution interne aqueuse

Les vésicules de DOPC avec une solution interne aqueuse sont formées avec la méthode d'électroformation. Les solutions internes utilisées sont des solutions de sucrose de concentrations comprises entre 20 et 50 mM.

2.1.5 Liposomes avec incorporation d'un gel d'agarose

Pour donner des propriétés élastiques au milieu interne des vésicules, nous avons voulu les fabriquer de telle manière qu'elles contiennent un gel viscoélastique. Le problème qui est donc apparu est que la solution dont on veut qu'elle constitue le milieu interne des vésicules et qui contient les macromolécules, doit rester fluide durant la formation, sans quoi la croissance et la fusion des vésicules est arrêtée.

Pour répondre à ces exigences, nous avons donc choisi un gel d'agarose¹¹ thermoréversible. C'est un polysaccharide extrait d'une algue marine, l'agar. Ses applications industrielles sont nombreuses (agent épaississant et gélifiant dans l'industrie agroalimentaire, industrie pharmaceutique, recherche en biologie (gel d'électrophorèse, milieu de culture, ...), ...). Il gélifie à une température de 36°C pour des concentrations supérieures à 0,05 % en masse (Arnott et al., 1974 ; Indovina et al., 1979 ; Letherby and Young, 1981).

Différentes concentrations d'agarose ont été utilisées : 0,07 %, 0,18 %, 0,36 % et 1 % w/w¹². Les solutions injectées dans la chambre d'électroformation sont des mélanges d'agarose à la concentration désirée et de sucrose (concentrations comprises entre 20 et 50 mM). Ces solutions de sucrose-agarose sont préparées environ une heure avant l'électroformation. On prépare d'abord la solution d'agarose qui doit être homogénéisée au moins une heure dans un bain Marie d'huile à 100°C, avant introduction du sucrose.

¹¹ agarose : Sigma, réf. A-6013

¹² w/w signifie en masse (w pour weight)

Toutes les vésicules contenant un gel d'agarose ont été formées avec des lipides DOPC et avec la méthode d'électroformation. Il a donc fallu adapter cette méthode de manière à conserver une solution fluide d'agarose durant la formation des vésicules, ce qui est réalisé en utilisant la propriété de thermoréversibilité de ce gel.

L'idée principale est de former les vésicules dans une solution d'agarose liquide, donc de température supérieure à 36°C, mais en dessous de 100°C pour ne pas endommager les lipides. Nous avons trouvé un bon compromis à 50°C, température à laquelle la gélification prend plus d'une demi-heure. Nous avons donc limité le temps de l'électroformation à 20 minutes pour nous assurer de n'avoir aucune phase gel. Ce temps est suffisamment long pour faire croître les vésicules sans qu'elles ne soient emprisonnées dans des gangues de gel. Pour conserver la température du système au-dessus de 50°C, nous avons utilisé un flux d'air chaud et avons contrôlé la température tout le long de la fabrication.

Voici donc les changements opérés par rapport à la méthode d'électroformation précédemment détaillée.

Une fois la solution d'agarose homogénéisée, on la laisse refroidir à une température de l'ordre de 60°C pour rajouter la masse de sucrose désirée. Nous appliquons le flux d'air chaud sur la chambre d'électroformation déjà en place et branchée à 0,2 V et 10 Hz. Tous les instruments qui seront nécessaires (seringues en verre d'injection avec aiguille métallique, seringue en plastique de prélèvement, bouteille plastique de stockage final des vésicules formées, aiguilles) sont placés sous le flux d'air à 50°C. On injecte dans la chambre (de la même manière que dans le protocole vu plus haut) la solution d'agarose-sucrose dont la température se situe entre 50 et 60°C. L'étanchéité de la chambre est d'autant plus importante que la chambre est sous flux d'air chaud (risque élevé d'évaporation de la solution).

De manière générale, on augmente la tension de 0,2V à 1,5-1,8 V pendant les 20 minutes, toujours en observant les fusions/éclatements et en modifiant la tension en conséquence. Typiquement, on monte de 0,2 à 0,5 V en 5 minutes, puis de 0,5 V à environ 0,8-1 V en 5 minutes et enfin, de 1 V à 1,5-1,8 V en 5 minutes. Au bout de 18 minutes après l'injection, on baisse la fréquence à 4 Hz et la tension à environ 0,3-0,5 V et on laisse le détachement des vésicules de la surface s'opérer pendant environ 2 minutes.

On prélève la solution de vésicules avec une seringue en plastique (préalablement chauffée) et possédant un embout avec large biseau pour éviter le cisaillement des vésicules. Puis on injecte les vésicules dans une solution de quelques mL de sucrose ou de glucose à la même concentration (entre 20 et 50 mM) et préalablement chauffée, de manière à diluer l'agarose extérieur aux vésicules à une concentration inférieure à 0,05 % en masse

(concentration critique de gélification). Ainsi, cette dilution permet d'éviter la gélification de l'agarose à l'extérieur des vésicules lorsque la température diminue. Autrement, les vésicules formées seraient figées dans un gel. Par contre, la solution interne aux vésicules gélifie lorsque la température diminue.

Les tailles des vésicules obtenues sont comprises entre 5 et 80 μm .

2.1.6 Liposomes avec glycolipides

Les vésicules sont préparées par électroformation ou occasionnellement par formation spontanée dans une solution mélange de sucrose (concentration de 20 mM ou 50 mM) et d'hépès à 0,2 mM (pH = 7,4).

Différentes solutions de lipides ont été utilisées pour les dépôts:

DOPC : lactosyl-céramide, 95 : 5 (proportions en moles)

DOPC : lactosyl-céramide, 90 : 10

SOPC : cholestérol : lactosyl-céramide, 60 : 30 : 10

SOPC : GM3, 90 : 10.

2.2 Microscopies

2.2.1 La microscopie à contraste de phase

Le microscope à contraste de phase a été développé dans les années 30 par Zernike, physicien hollandais qui reçut le Prix Nobel en 1953 pour cette invention (Zernike, 1942a ; b).

Pour bien comprendre la particularité du microscope à contraste de phase, intéressons-nous au microscope à fond clair et à la différence entre objets d'amplitude et objets de phase.

Les objets observables au microscope à fond clair sont des objets d'amplitude qui agissent sur la lumière soit en modifiant son intensité soit en absorbant plus ou moins les différentes longueurs d'onde de cette lumière. Au contraire, les objets de phase, par exemple des cellules vivantes, ne modifient que très peu les degrés de luminosité et de couleurs. Les cellules vivantes sont donc inobservables avec un microscope à fond clair. D'où le besoin d'un nouveau type de microscope, le microscope à contraste de phase, dont la principale application est l'observation d'objets biologiques tels des cellules vivantes. Les objets de phase, comme leur nom l'indique, seront détectés par les différences de phase qu'ils engendrent. En intervenant sur le trajet des rayons lumineux, le microscope à contraste de

phase donne une image d'amplitude à partir de la structure de phase de l'objet observé. Même de très faibles différences de phase peuvent être transformées en différences de luminosité nettement visibles.

Mais comment obtenir une image d'amplitude à partir d'un objet de phase? Pour répondre à cette question, revenons sur le processus de formation d'une image à partir d'un objet grâce à un microscope.

L'objectif d'un microscope donne de l'objet AB une image intermédiaire A1B1 qui est, d'après la théorie d'Abbe, la résultante d'interférences, au plan de formation de l'image, entre la lumière d'éclairage YE (lumière directe) et la lumière diffractée YD, en provenance de chaque point de l'objet. Positives ou négatives, ces interférences donnent naissance à une vibration lumineuse résultante Y1 d'amplitude plus ou moins grande, et l'image d'un point de l'objet apparaît ainsi plus ou moins lumineuse.

C'est au niveau du déphasage entre l'onde diffractée et l'onde directe qu'intervient la différence entre objets d'amplitude et objets de phase.

Dans le cas d'un objet d'amplitude, l'onde YD correspondant à la lumière diffractée par l'objet est déphasée de 180° par rapport à YE. A chaque point du plan de formation de l'image intermédiaire, l'onde résultante, $Y1=YE+YD$ forme l'image de l'objet. Comme YD est déphasée de 180° par rapport à YE, l'onde résultante Y1 aura une amplitude plus faible que YE et d'autant plus faible que l'intensité YD de la lumière diffractée sera grande. L'image des différents points de l'objet sera alors plus ou moins sombre, alors que le fond de la préparation sera plus clair, l'image du fond n'étant due qu'à la lumière directe YE, puisque aucun point de l'objet ne diffracte la lumière à cet endroit. On comprend donc comment un objet d'amplitude est responsable de la plus ou moins grande amplitude de Y1. Il est donc observable en fond clair et donnera une image contrastée.

Au contraire, dans le cas des objets de phase, l'onde diffractée YD n'est déphasée que d'environ 90° par rapport à YE. L'onde Y1 ($=YE+YD$), résultant de l'interférence entre YE et YD aura alors une amplitude très voisine de YE et un déphasage avec YE de seulement quelques degrés (Fig. 2_5).

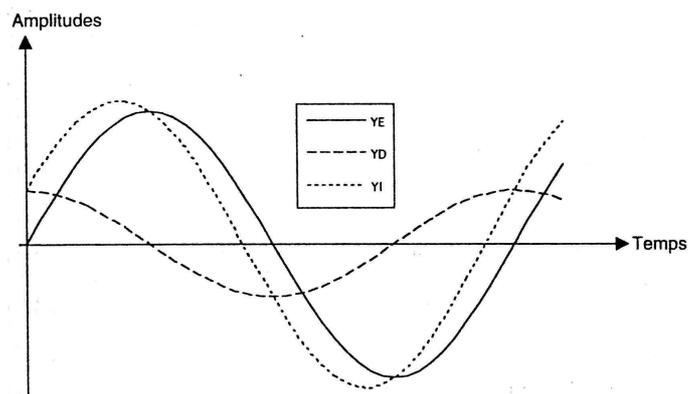


Figure 2_5: Interférences entre YE et YD pour un objet de phase (tiré de Péré, 1994).

Ces objets ne seront donc pas visibles en fond clair.

L'idée physique qui vient alors naturellement est de rajouter un déphasage de 90° pour le ramener à 180° . La solution technique la plus souvent utilisée consiste à retarder de 90° l'onde d'éclairement YE. Pour obtenir une image d'amplitude d'un objet de phase, le microscope doit permettre de déphaser de 90° l'onde d'éclairement sans modifier l'onde diffractée. C'est ce que fait le microscope à contraste de phase grâce à son optique particulière constituée d'un condenseur à diaphragme annulaire et d'un objectif à anneau de phase (lame quart d'onde conjuguée au diaphragme annulaire) (Fig. 2_6).

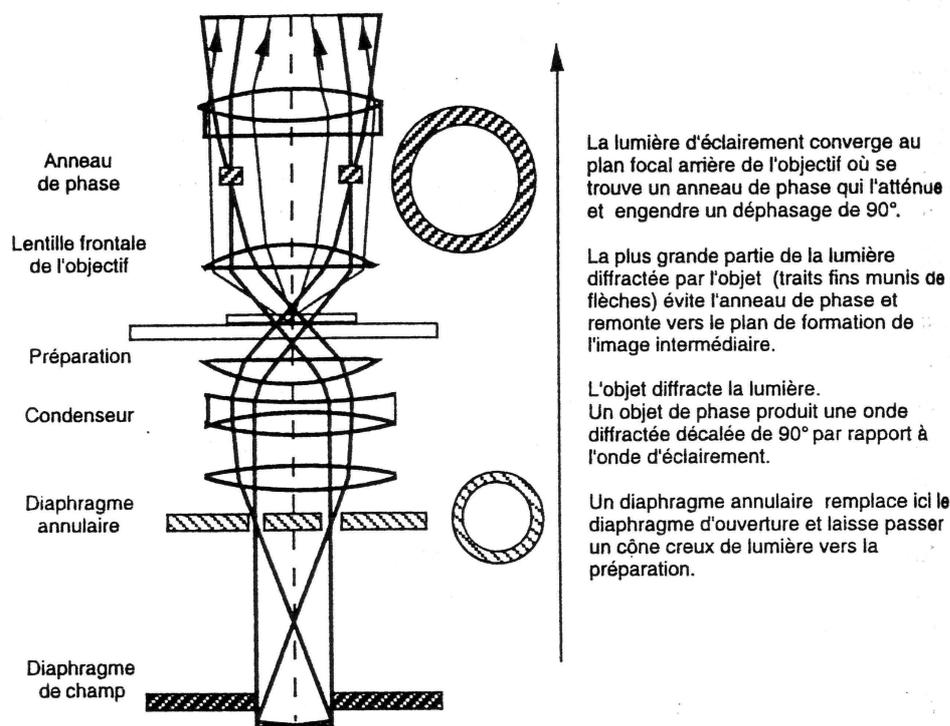


Figure 2_6:
Détail du fonctionnement d'un microscope à contraste de phase.
 Eléments optiques spécifiques du microscope à contraste de phase et fonctionnement (tiré de Péré, 1994).

Signalons enfin un inconvénient dans l'observation en contraste de phase : l'effet de halo. Un halo clair se forme en effet autour des détails sombres de l'image et un halo sombre est visible autour des détails clairs. Ces halos gênent l'observation des contours et diminuent la précision de mesures en microscopie à contraste de phase. La résolution de ce microscope est de l'ordre du micron.

L'intérêt de mettre une solution de sucrose à l'intérieur de la vésicule et une solution de glucose à l'extérieur est maintenant clair : cela permet de changer la phase de la lumière incidente du fait de la différence des indices de réfraction interne du sucrose et externe du glucose. La différence de phase s'écrit :

$$\varphi = 2\pi\delta / \lambda,$$

où δ est la différence de marche, et λ est la longueur d'onde de la lumière incidente. La différence de marche s'écrit :

$$\delta = e (n_{\text{suc}} - n_{\text{glu}}),$$

où e est l'épaisseur de l'objet et n_{glu} , n_{suc} sont les indices de réfraction de la solution externe de glucose et interne de sucrose, respectivement.

Avec ces deux solutions de sucrose et de glucose, on obtient donc un bon contraste de l'image entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. Un objet d'indice supérieur à celui du milieu extérieur apparaîtra noir sur fond clair.

De plus, le sucrose ayant un poids moléculaire supérieur à celui du glucose, les vésicules sédimentent, ce qui facilite leur observation.

L'observation des vésicules pendant l'électroformation est faite avec un microscope à contraste de phase Olympus IMT2.

Pour réaliser les expériences de dégonflement osmotique et de cisaillement hydrodynamique, nous avons utilisé un microscope Leica DMIRB que l'on a penché horizontalement pour les expériences de cisaillement hydrodynamique.

2.2.2 La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence prend de plus en plus d'importance en biologie, notamment du fait de la large utilisation des immunomarquages, de la disponibilité d'outils physiques d'imagerie qui offrent une excellente résolution spatiale et dynamique des images d'échantillons biologiques, de son utilisation dans d'autres techniques de microscopies comme la microscopie confocale et celle à plusieurs photons. D'autre part, depuis une vingtaine d'années, la possibilité de construire des protéines de fusion avec des protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescent Protein) a encore grandement élargi l'éventail d'utilisation de la microscopie de fluorescence. Enfin, il est aussi important de se rappeler que la fluorescence est une propriété de la matière et qu'ainsi les caractéristiques physiques de la lumière de fluorescence émise sont sources d'informations sur la structure, l'orientation et l'environnement des molécules fluorescentes au sein d'un échantillon.

Pour obtenir une image de fluorescence à partir d'un échantillon contenant des molécules fluorescentes, il faut d'abord exciter ces molécules, c'est-à-dire les faire « sauter » de leur état fondamental vers un état excité (transitions électroniques vers des états excités instables). Ceci se fait par absorption d'énergie des photons incidents dirigés sur l'échantillon et émis par une lampe à incandescence (tube à décharge). A la suite de son excitation, le

fluorochrome se désexcite en revenant sur l'un des états vibrationnels du niveau électronique fondamental. L'émission de lumière de fluorescence correspond uniquement à la transition de l'état vibrationnel inférieur du singulet S_1 vers l'un des états vibrationnels du niveau fondamental S_0 . Ainsi le pic d'émission de fluorescence est décalé vers le rouge par rapport au pic d'absorption (Fig. 2_7).

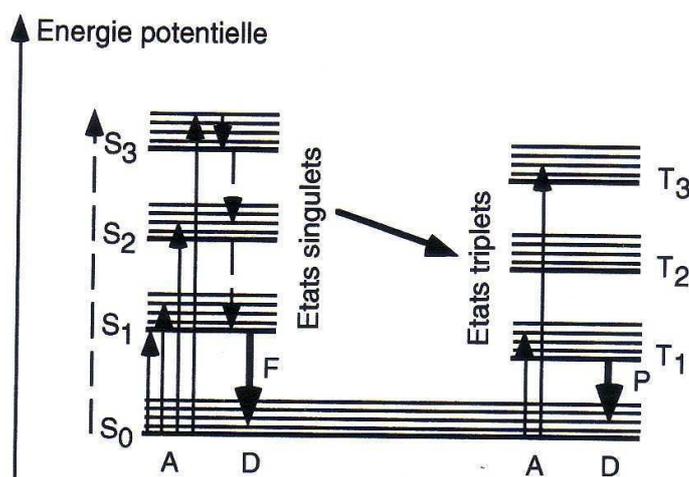


Figure 2_7: Etats électroniques d'une molécule. A et D représentent les chemins d'excitation (absorption) et de désexcitation de la molécule. F et P représentent respectivement les émissions de fluorescence et de phosphorescence (tiré de Cibert, 2005).

D'un point de vue pratique, pour obtenir une image de fluorescence, il faut donc illuminer l'échantillon contenant les fluorophores avec une lumière appropriée pour les exciter. Il faut ensuite recueillir la lumière de fluorescence en éliminant les sources de lumière parasite (dont la lumière incidente d'excitation fait partie). En effet, la lumière de fluorescence est toujours très faible par rapport à l'intensité de la lumière excitatrice. C'est pour cette raison que l'on recueille la lumière de fluorescence dans une direction perpendiculaire au faisceau incident et que l'objectif joue à la fois le rôle du condenseur (illuminateur) et de l'objectif du microscope droit conventionnel. Un des éléments centraux d'un microscope de fluorescence est donc le bloc filtre (Fig. 2_8). Ce bloc contient trois éléments, un filtre monochromateur d'excitation, un miroir dichroïque, et un filtre monochromateur d'émission. Le premier filtre d'excitation permet à partir du faisceau polychromatique de la lampe d'exciter l'échantillon avec le faisceau monochromatique approprié. Le miroir dichroïque a des propriétés de réflexion qui ne sont pas les mêmes en fonction de l'angle d'incidence des faisceaux lumineux. Il permet donc d'une part, d'envoyer le faisceau monochromatique d'excitation vers l'échantillon à travers l'objectif, et d'autre part, de récupérer la lumière de fluorescence monochromatique émise par l'échantillon. Par ailleurs, comme le faisceau incident est toujours très intense par rapport à la lumière de fluorescence émise, il faut supprimer la lumière incidente diffusée par l'échantillon qui

pourrait masquer l'émission de fluorescence. C'est le rôle du filtre monochromateur d'émission qui sélectionne une bande de longueurs d'onde correspondant au maximum d'émission des fluorophores et coupe totalement le faisceau diffusé d'excitation.

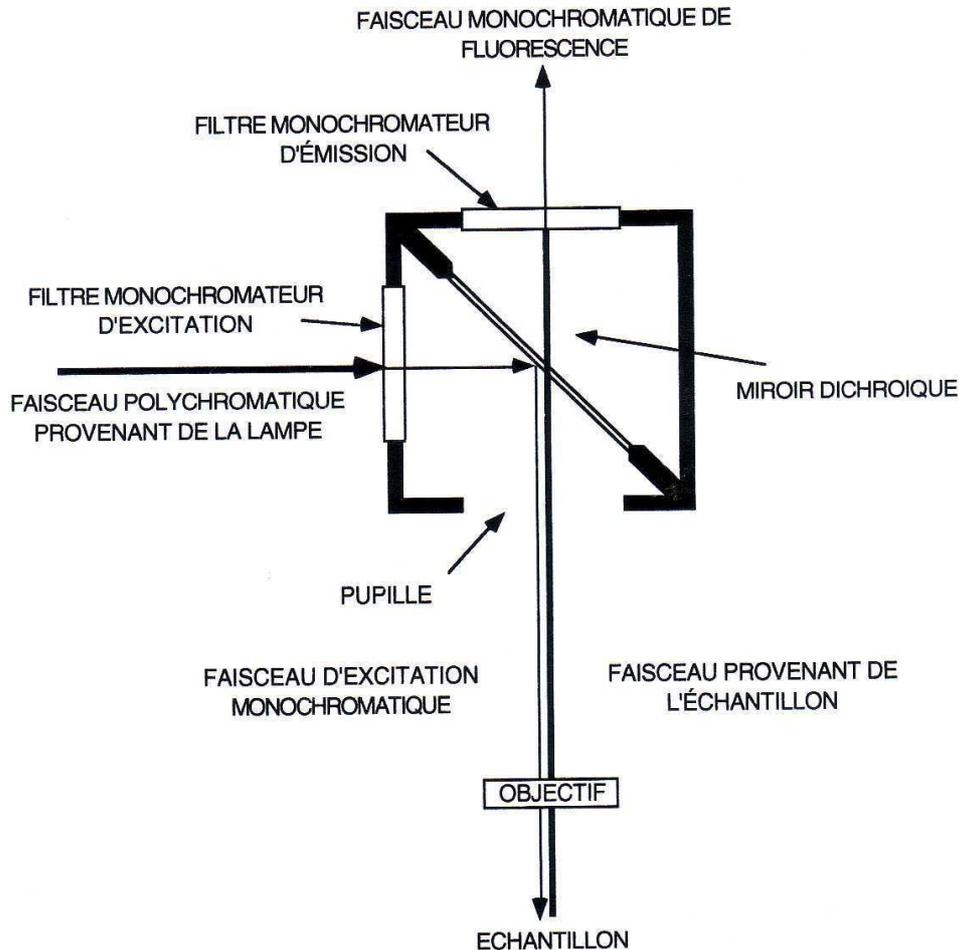


Figure 2_8: Schéma d'un bloc filtre (tiré de Cibert, 2005).

A chaque fluorochrome caractérisé par ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission, est associé un bloc filtre contenant les filtres d'excitation, d'émission et le miroir dichroïque spécifiques.

Par rapport à un microscope classique à transmission, la seule modification pour le statif d'un microscope à fluorescence consiste en la mise en place d'un montage optique qui permette, à travers l'objectif, à la fois d'illuminer l'échantillon et de collecter la lumière de fluorescence (Fig. 2_9). L'objectif joue donc les rôles de l'objectif et du condenseur. Pour accroître l'intensité de la lumière envoyée sur l'échantillon, le tube à décharge est placé devant un miroir concave. Ceci fait que deux faisceaux vont être focalisés sur l'échantillon : le faisceau « direct », formé à partir des photons émis directement par l'arc de la lampe, et le

faisceau « réfléchi », constitué à partir de l'image de l'arc de la lampe formée par le miroir concave.

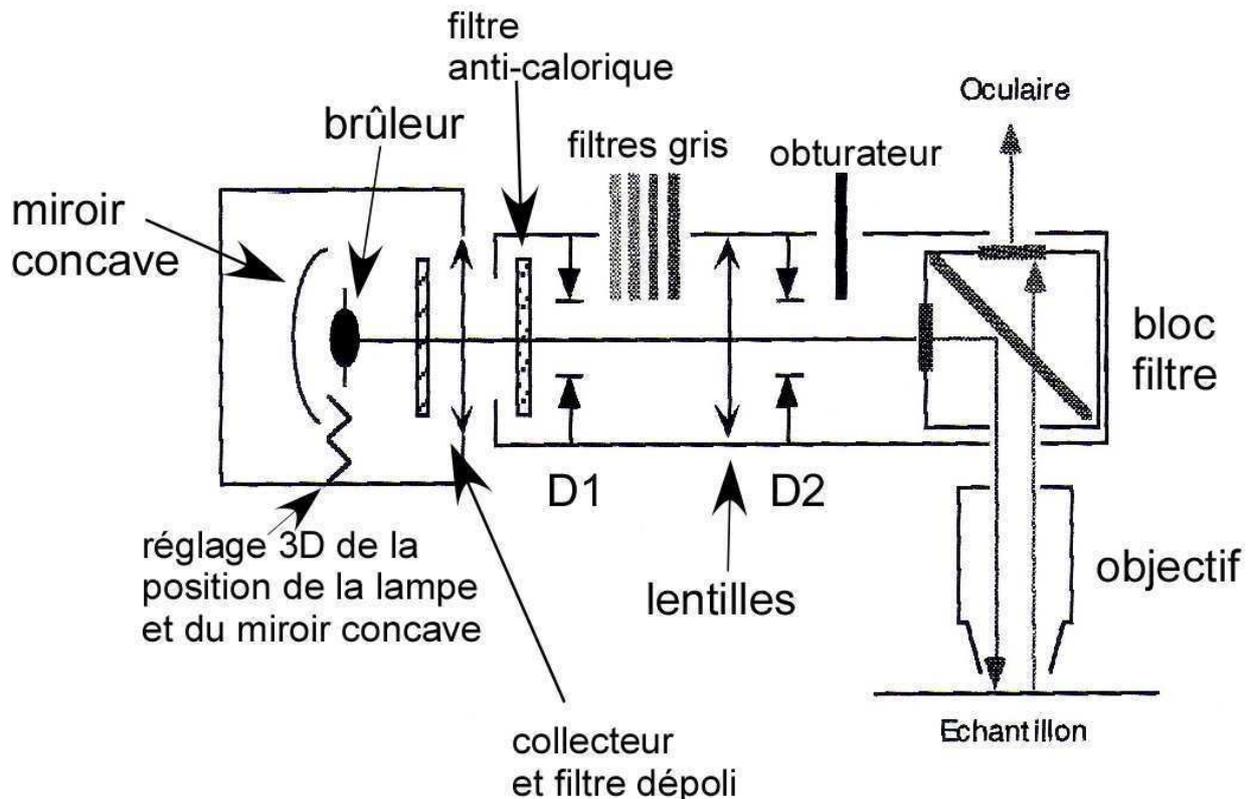


Figure 2_9: Schéma du trajet optique dans un microscope de fluorescence.

D1 : diaphragme de champ (équivalent au diaphragme de champ du banc optique du microscope droit). Si on ferme ce diaphragme, on doit voir apparaître son image dans le plan échantillon illuminé. Cette image doit être parfaitement centrée par rapport au champ observé. La série de filtres gris sert à atténuer l'intensité du faisceau incident. D2 : diaphragme d'ouverture (équivalent au diaphragme d'ouverture placé dans le plan focal avant du condenseur du microscope droit). Si on ferme ce diaphragme, l'intensité reçue par l'échantillon diminue, mais, en contrepartie, la résolution du microscope peut être légèrement diminuée. Il est préférable d'utiliser les filtres gris pour atténuer l'intensité de l'illumination et éviter le blanchiment de l'échantillon (adapté de Cibert, 2005).

Le trajet optique du microscope à fluorescence (comme celui à contraste de phase) obéit au principe de Köhler (Fig. 2_10). Il faut donc ajuster l'épimicroscope en se rappelant qu'il n'y a pas de condenseur et en réglant la position de la lampe et du miroir concave. Hormis le bloc lampe et le bloc filtre, les éléments les plus importants placés dans le trajet optique sont l'obturateur (qui permet d'éviter le photobleaching ou blanchiment en dehors des périodes de prise de vue) et une série de filtres neutres qui atténuent l'intensité du faisceau incident sans en altérer la composition spectrale, ceci encore pour limiter le blanchiment et la destruction de l'échantillon par effet Joule. Des filtres anti-caloriques permettent d'éliminer partiellement la quantité d'énergie calorifique délivrée par le tube à décharge.

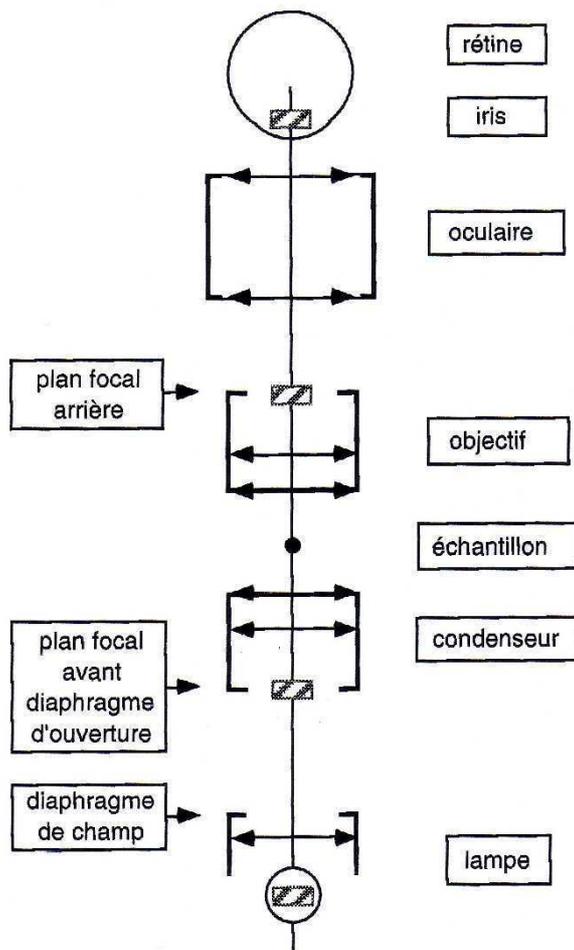


Figure 2_10: Principe de Köhler.

Le principe de Köhler établit que le filament de la lampe, le diaphragme d'ouverture du condenseur, le plan focal arrière de l'objectif et l'iris de l'œil sont conjugués. L'ajustement de Köhler consiste en deux réglages : 1) l'ajustement de la conjugaison des champs (mise au point sur un objet et ajustement de la position du condenseur en fermant la diaphragme de champ), et 2) en ôtant un oculaire du microscope (ou en utilisant une lentille de Bertrand), on doit observer la superposition des images de la lampe, du plan focal avant du condenseur (diaphragme d'ouverture) et du plan focal arrière de l'objectif. Il est nécessaire de refaire systématiquement cet ajustement (tiré de Cibert, 2005).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé plusieurs microscopes de fluorescence :

- un AXIOVERT 135TV (Zeiss) avec un objectif Plan-Neofluar 100x/1,30 oil (Zeiss)
- un Leica DM IRB avec différents objectifs.

La source lumineuse du microscope à fluorescence est une lampe à vapeur de mercure. Celle-ci émet un spectre de raies lumineuses situées dans tout le visible et dans l'ultraviolet, au-dessus de 300 nm.

Dans l'étude du greffage de lectines sur un substrat de verre, j'ai utilisé une lectine marquée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La FITC est un marqueur qui est excité par des radiations lumineuses bleues (pic d'absorption centré autour de 497 nm) et qui émet une fluorescence verte avec un pic d'émission centré autour de 521 nm.

2.3 Application d'un choc osmotique

Le dispositif d'application d'un choc osmotique a été réalisé pour observer le dégonflement progressif ou rapide de vésicules soumises à un choc hyper-osmotique. La

pression osmotique que subissent les vésicules est créée par augmentation de la concentration de glucose à l'extérieur des vésicules.

Le dispositif doit permettre 1) d'augmenter cette concentration de manière uniforme dans toute la chambre, sans provoquer de courants de convection, 2) d'observer les vésicules dans de bonnes conditions optiques, dès le début de l'application du choc.

L'existence de mouvements de convection importants aurait pour conséquence d'appliquer sur les vésicules un choc osmotique non uniforme et fluctuant ainsi qu'un stimulus non désiré, de nature hydrodynamique. D'autre part, l'apparition de mouvements de convection aurait aussi pour conséquence d'entraîner un mouvement important des vésicules, empêchant alors de les observer dans de bonnes conditions. Enfin, la présence d'un ménisque au niveau d'une surface libre de liquide est très gênante pour l'observation microscopique et doit être éliminée.

Finalement, j'ai opté pour l'utilisation d'un assemblage de chambres parallélépipédiques en caoutchouc¹³ de base carrée de 25 mm de côté, de profondeur 2,5 mm et trouées en leur centre sur un diamètre de 20 mm. Pour les utiliser dans ce dispositif, il est nécessaire de détacher le plastique transparent collé sur le caoutchouc en plongeant les chambres quelques heures dans un solvant (par exemple, éthanol). De l'autre côté du caoutchouc, la surface est traitée pour adhérer à une surface de verre. L'adhérence est aussi bonne entre deux chambres, ce qui permet de les assembler les unes sur les autres avec une bonne étanchéité (Fig. 2_11). Si toutefois, la colle entre le plastique et le caoutchouc ne part pas complètement, des fuites peuvent apparaître. On peut alors utiliser une pâte silicone¹⁴ en faible quantité pour assurer l'étanchéité entre deux chambres successives.

Une lame de verre (lavée détergent, eau, éthanol, eau et séchée à l'argon) permet le positionnement d'une première chambre, dans laquelle sont déposées les vésicules dans des conditions iso-osmolaires. Typiquement, le volume de la chambre étant d'environ 0,8 mL, on injecte 0,4 mL d'une solution de glucose 20 mM et 0,4 mL de la solution de vésicules ayant pour milieu interne soit une solution de sucrose 20 mM, soit un mélange d'une solution de sucrose 20 mM avec un gel d'agarose.

Sur cette première chambre est déposé un filtre inorganique poreux transparent¹⁵ (pores de 0,2 μm). Une deuxième chambre en caoutchouc est alors placée de manière étanche sur la première et sur le contour de la membrane poreuse. Cette chambre va pouvoir accueillir

¹³ chambres d'incubation pour lames de microscopie de marque GRACE Bio-Labs, Coverwell, Imaging chambers, achetées chez Merck Eurolab (Poly Labo), réf. 26704

¹⁴ pâte silicone : Rhône-Poulenc, réf. 70428

¹⁵ Membrane ANODISC de diamètre 25 mm, Merck Eurolab, réf. 69908.01

une solution de glucose de concentration supérieure à 20 mM, permettant ainsi d'appliquer le choc hyper-osmotique. Le filtre poreux permet de faire diffuser la solution hyper-osmotique de glucose en évitant des mouvements de convection importants.

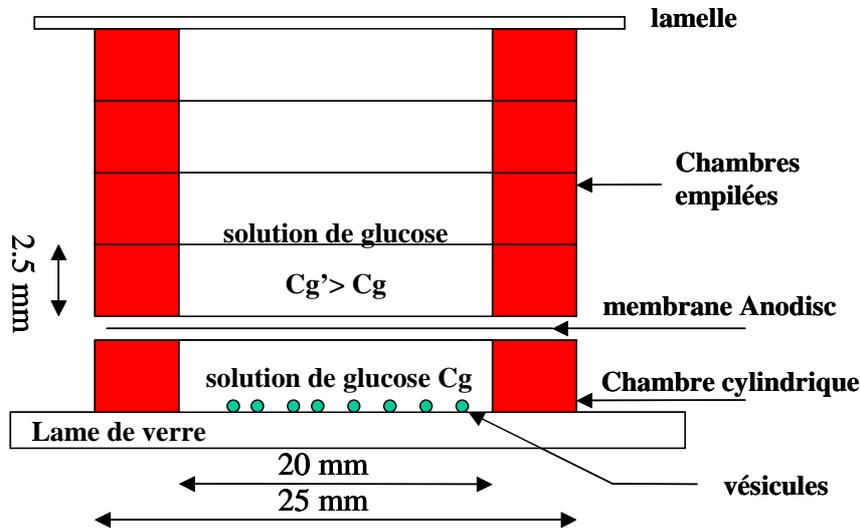


Figure 2_11: Dispositif utilisé pour appliquer un choc osmotique aux vésicules. En rouge, les chambres en caoutchouc.

Deux options sont possibles selon que l'on veut appliquer un choc de manière progressive ou de manière rapide. Si l'on désire appliquer un choc osmotique rapide, on choisit de poser simultanément quatre chambres que l'on remplira d'un seul tenant d'une solution hyper-osmolaire de glucose. Si l'on désire appliquer un choc osmotique progressif, étape par étape, on ajoute une chambre que l'on remplit d'une solution hyper-osmolaire de glucose, puis on observe le dégonflement. On répète ce cycle d'opérations (installation d'une chambre supplémentaire au-dessus, remplissage de son volume avec une solution hyper-osmolaire de glucose, phase d'observation du dégonflement) autant de fois que l'on veut (typiquement quatre). Chaque phase d'observation après le remplissage d'une nouvelle chambre dure typiquement de 40 minutes à une heure (expérimentalement, 40 minutes sont suffisantes pour que les vésicules atteignent leur forme d'équilibre).

Pour éviter les effets optiques gênants dus à la présence de ménisque, une lamelle est déposée au-dessus du dispositif après chaque remplissage de manière à aplanir la surface de liquide. Cette lamelle permet aussi d'éviter toute évaporation.

Ainsi, ce dispositif permet, de par sa construction, d'appliquer des chocs osmotiques de manière progressive ou de manière brutale. L'observation du processus de dégonflement de vésicules, dans de bonnes conditions optiques, est possible dès les premiers instants suivant l'injection de la solution de glucose hyper-osmotique. Les mouvements de convection dus à l'addition de glucose concentré sont limités, ce qui permet de suivre aisément une vésicule éventuellement en mouvement.

2.4 Application d'une contrainte de cisaillement

2.4.1 Chambre à flux

La chambre que nous utilisons pour cisailer les vésicules et pour obtenir une vue de côté, est une chambre en quartz de spectrophotométrie à 4 faces optiques et à circulation. Elle a été réalisée¹⁶ sur mesures (Fig. 2_12) et les deux extrémités ouvertes permettent la circulation du fluide utilisé pour appliquer la contrainte de cisaillement, ainsi que l'introduction d'une lamelle. L'observation à l'aide du microscope à contraste de phase¹⁷ s'effectue au travers de la tranche la plus fine (en vue de côté).

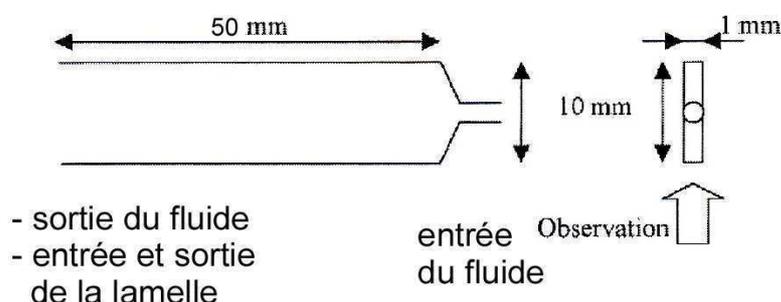


Figure 2_12: Schéma de la chambre à flux à 4 faces optiques (adapté de Abkarian, 2002).

Pour observer les vésicules perpendiculairement à la gravité (ce que nous appelons « la vue de côté »), nous couchons le microscope à l'horizontale, pour éclairer la chambre en lumière rasante par la tranche (Fig. 2_13).

Pour réaliser les expériences d'adhésion spécifique, une lamelle recouverte de la lectine désirée¹⁸ est introduite dans la chambre et constitue ainsi la surface inférieure de la chambre.

Entre chaque expérience, la lamelle inférieure est retirée et la chambre est plongée plusieurs heures dans un bain d'eau et d'acide sulfochromique en proportions volumiques 1:1. Après un rinçage abondant à l'éthanol et à l'eau bidistillée, la chambre est séchée sous flux d'argon pur et est conservée dans un papier optique à l'abri de la poussière.

Avant de les injecter dans la chambre de cisaillement, les vésicules sont légèrement dégonflées dans une solution de glucose de concentration, c_g , légèrement supérieure à celle de la solution de sucrose du milieu interne des vésicules. Typiquement, c_g vaut 55 mM si la concentration de la solution de sucrose interne des vésicules vaut 50 mM.

¹⁶ par la société Hellma

¹⁷ Leica DMIRB

¹⁸ voir le paragraphe *Traitement de la surface inférieure*



Figure 2_13:
Microscope couché pour permettre la vue de côté (tiré de Abkarian, 2002).

Une fois la chambre installée sur le microscope (il est important de bien régler l'horizontalité de la chambre), nous procédons à son remplissage avec une solution de glucose (de concentration c_g) et d'hépès 0,2 mM (pH = 7,4). L'injection des vésicules dans la chambre se fait à l'aide d'un raccord en Y (Fig. 2_14).

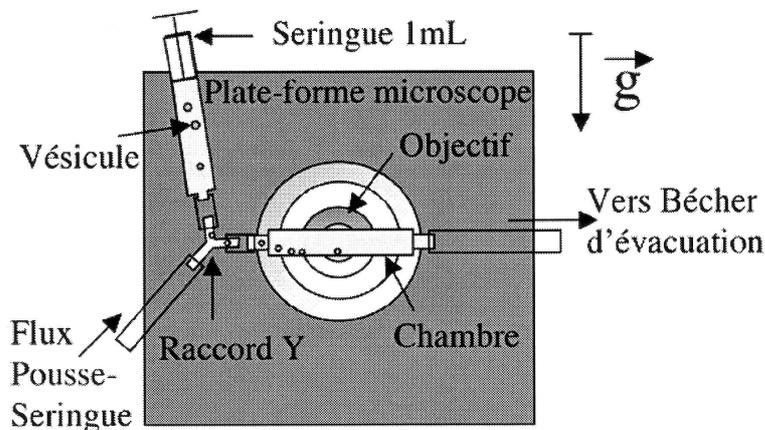


Figure 2_14:
Schéma du dispositif expérimental pour les expériences en chambre à flux (tiré de Abkarian, 2002).

L'écoulement est produit dans la chambre grâce à un pousse-seringue¹⁹ muni d'un moteur pas à pas. Ce dernier crée un écoulement de débit constant (pour des débits pas trop faibles), de valeur minimale 0,254 mL/h pour une seringue en plastique standard de 5 mL, et de valeur maximale 143 mL/h en utilisant une seringue de 50 mL. Le débit est augmenté grâce à une molette possédant 100 crans (on note q la valeur du cran de 0 à 99). A chaque valeur entre 0 et 99 correspond une vitesse d'avancée du piston de la seringue. En conséquence, à chaque couple d'une valeur q , entre 0 et 99, et d'une seringue de diamètre

¹⁹ pousse-seringue de chez Fischer BioBlock

donné correspond un débit (produit de la vitesse d'avancée du piston par la section de la seringue).

2.4.2 Calcul de la contrainte hydrodynamique appliquée et du taux de cisaillement

Pour calculer la contrainte hydrodynamique appliquée par un écoulement circulant dans une chambre à flux de ce type, on fait l'approximation que la largeur l est très grande devant l'épaisseur e (Fig. 2_15).

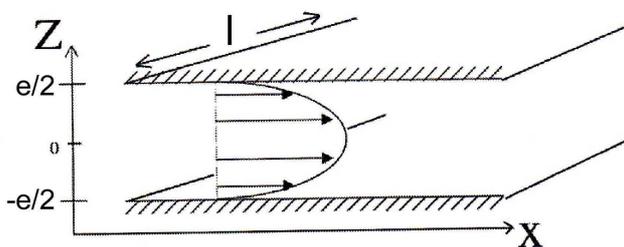


Figure 2_15:
Champ parabolique des vitesses dans la chambre d'écoulement.

On peut donc ramener ce calcul au cas d'un écoulement suivant la direction Ox entre deux plaques planes, parallèles et infinies. On se trouve alors dans le cas d'un écoulement de Poiseuille plan. Dans le cadre de cette approximation, on peut écrire la vitesse du fluide sous la forme $\mathbf{v} = v(z) \mathbf{e}_x$, où \mathbf{e}_x est un vecteur unitaire orienté selon l'axe Ox. Le liquide utilisé est un fluide newtonien et est incompressible, ainsi l'équation du mouvement du fluide est l'équation de Navier-Stokes.

Cette équation se simplifie, en régime permanent, en

$$\eta \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} = \frac{\partial P}{\partial x},$$

où P est la pression et η est la viscosité dynamique (en Pa.s).

En intégrant cette équation et compte tenu des conditions aux limites $v(z = 0) = v(z = e) = 0$, on trouve que la solution est de la forme :

$$v(z) = kz(e - z)$$

où k est une constante.

Le débit volumique vaut

$$D = \int_{-l/2}^{l/2} dy \int_0^e v(z) dz = \frac{kle^3}{6}$$

d'où l'on tire la valeur de la constante k. En reportant dans l'expression de v on obtient :

$$v = \frac{6D}{le^3} z(e - z)$$

La contrainte exercée par les forces visqueuses (ou contrainte de cisaillement) au niveau de la paroi s'écrit :

$$\sigma = \eta \left. \frac{\partial v}{\partial z} \right)_{z=0}$$

et on obtient alors

$$\sigma = \frac{6D\eta}{le^2}$$

Le taux de cisaillement, G, est défini par la relation suivante :

$$\sigma = \eta G = \eta \left. \frac{\partial v}{\partial z} \right)_{z=0}$$

et l'on obtient donc pour le taux de cisaillement :

$$G = \frac{6D}{le^2}$$

Ces relations ne sont valables qu'à proximité de la paroi inférieure. A l'échelle d'une vésicule de 50 μm qui se trouve près de la surface inférieure, elles doivent donc être vérifiées. Dans ces conditions, le profil du champ des vitesses est théoriquement linéaire.

2.4.3 Validation du calcul théorique

Pour vérifier que la relation $G = 6D/le^2$ s'applique bien à proximité de la paroi, nous avons mesuré la vitesse de billes de latex de diamètre 2 μm soumises à des écoulements de débits connus en fonction de leur distance au substrat, pour des distances inférieures à 100 μm .

Pour un débit fixé (une valeur du cran q du pousse-seringue et une seringue donnée), nous mesurons la vitesse des billes en fonction de leur distance h à la paroi (Fig. 2_16).

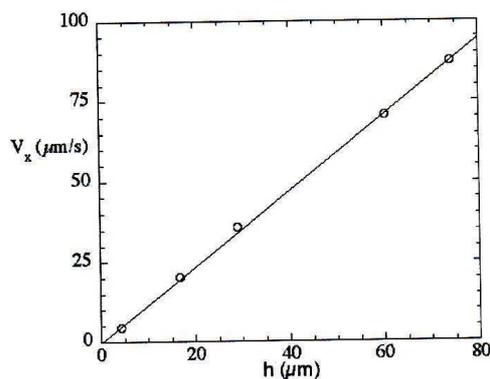


Figure 2_16: Courbe vitesse des billes fonction de la distance h des billes à la paroi. La relation est linéaire (tiré de Abkarian, 2002).

Nous vérifions que cette relation est linéaire, ce qui nous permet de mesurer G , étant donné que :

$$G = \left. \frac{\partial v}{\partial z} \right)_{z=0}$$

En faisant cette étude pour différentes valeurs du débit, on peut alors tracer la courbe du taux de cisaillement en fonction du débit ou du paramètre q (pour une seringue donnée). Cette courbe est tracée dans la Figure 2_17, et montre une relation linéaire entre ces deux paramètres, ce qui valide qualitativement le calcul théorique de G en fonction du débit.

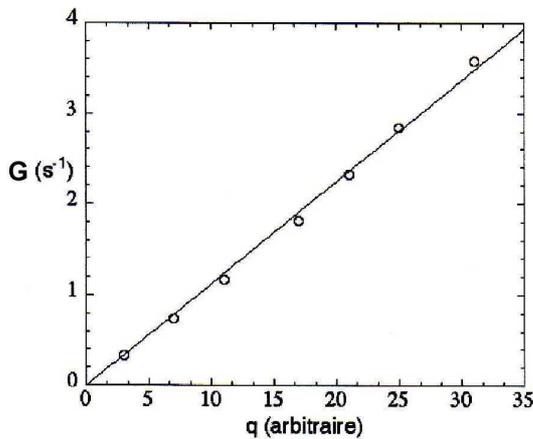


Figure 2_17: taux de cisaillement en fonction du débit dans la chambre (le débit est indiqué par le cran q du pousse-seringue ; adapté de Abkarian, 2002).

En mesurant la pente de cette courbe, on obtient pour $6/le^2$, la valeur de $0,778 \text{ mm}^{-3}$. En considérant maintenant les dimensions de la chambre déclarées par le constructeur : $l = 9,5 \text{ mm}$ et $e = 0,9 \text{ mm}$, nous trouvons $6/le^2 = 0,780 \text{ mm}^{-3}$. Ces deux valeurs sont très proches. Cela permet de valider quantitativement le calcul théorique de G , et de vérifier que notre approximation de départ est acceptable.

Remarquons que ces mesures de vitesses de billes en fonction de leur hauteur et du débit sont réalisées avec des billes distantes de plus de 1 mm de la face optique se trouvant devant l'objectif (1 mm dans la direction Oy). Si l'on se rapproche trop de cette surface latérale, celle-ci influence le champ de vitesse et l'approximation d'un écoulement de Poiseuille plan n'est plus valable.

2.5 Traitement de surface, greffage de lectines

Pour effectuer les expériences d'adhésion spécifique, nous voulons fabriquer des substrats de verre sur lesquels sont greffées de manière covalente les lectines d'intérêt. Les

lamelles de verre²⁰ sont prétraitées²¹ de manière à pouvoir greffer les lectines à l'aide d'un protocole simple.

Ce protocole de greffage covalent des lectines sur les lamelles prétraitées Xenobind est le suivant :

- Préparer une solution de lectine et PB²² (0,05 M). Le pH de cette solution doit être supérieur au point isoélectrique de la lectine. Nous avons choisi une concentration en lectine de 40-100 µg/mL.

- Plonger la plaque de verre dans 10 mL de cette solution, puis incuber soit pendant deux heures à 37°C, soit toute une nuit à température ambiante.

- Enlever la solution de lectine et laver la plaque avec 15 mL d'une solution de PB 50 mM, de pH 7.5 contenant 0.15 M de NaCl et 0.1 % (en volume) de Tween 20 ou de Triton X-100, tout en agitant légèrement pendant quinze minutes.

- Enlever cette solution et ajouter 20 mL d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 3 % en masse préparée dans du PBS. Incuber une nouvelle fois, soit deux heures à 37°C, soit toute une nuit à température ambiante. La BSA permet de saturer les sites non occupés par la lectine. Alternativement, on peut utiliser de l'éthanolamine à la place de la BSA.

- Laver la plaque une première fois avec 20 mL de PBS 50 mM contenant 0.1 % de Tween 20 ou de Triton, et ensuite trois fois avec 15 mL d'une solution de PBS 50 mM de pH 7.5 contenant 0.15 M de NaCl. Nous voulons ainsi éliminer le Tween 20 qui est un détergent et qui risquerait d'endommager les vésicules. Enfin, on place la plaque dans une solution tampon de PBS de pH 7.4 et contenant 0.1 % de NaN₃ (un anti-bactérien). On conserve la plaque à 4°C.

Nous avons utilisé comme lectines :

- la lectine PNA (Peanut agglutinin from *Arachis hypogaea* ; Lotan et al., 1975)²³ en couple avec le glycolipide LacCer
- la lectine PNA fluorescente, marquée au FITC²⁴
- la lectine MAL1²⁵ en couple avec le glycolipide GM3.

²⁰ lamelles de dimensions 9x50 mm de chez Poly-Labo

²¹ traitement effectué par la société Xenopore Corp. : traitement Xenobind, covalent binding, réf. VXB, www.xenopore.com/xenobind.htm

²² PB : phosphate buffer

²³ PNA : Sigma-Aldrich, réf. L0881

²⁴ PNA fluorescente : Sigma-Aldrich, réf. L7381

²⁵ MAL1 : Vector Laboratories, réf. L-1310

2.6 Acquisition, numérisation, traitement et analyse d'images

2.6.1 Acquisition et numérisation des images

Les expériences sont filmées avec une caméra CCD (Cohu 4910) placée sur le microscope à contraste de phase Leica DM IRB. Cela permet d'obtenir une image en temps réel sur un écran de télévision. Les images sont enregistrées à l'aide d'un magnétoscope SVHS branché sur la caméra.

Les séquences sont ensuite sélectionnées et numérisées sur ordinateur (Mac G8) avec une carte Scion LG-3. Le nombre d'images par unité de temps est choisi en fonction des analyses que l'on veut effectuer.

Le logiciel de numérisation et de traitement d'images que nous avons utilisé est le logiciel gratuit NIH Scion Image 1.62c²⁶.

2.6.2 Traitement et analyse d'images

Pour quantifier le volume de vésicules en train de se dégonfler, nous avons utilisé la procédure suivante. D'abord, nous avons trouvé le contour de la vésicule en appliquant un filtre Laplacien, un filtre moyenne, et un seuillage. Cette succession d'opérations donnent une image binaire avec un contour noir de la vésicule sur un fond blanc. Puis nous avons calculé la position du centre de masse de ce contour à l'aide d'une macro écrite sous NIH Scion Image. A partir de ce centre de masse, 36 rayons obtenus par rotations successives de 10° ont été mesurés (distance du centre de masse au contour) et leur moyenne a fourni un rayon moyen de la vésicule. Nous avons ensuite calculé le volume de la vésicule comme étant celui de la sphère équivalente, en faisant l'hypothèse de formes axisymétriques. A partir de cette évaluation du volume, nous avons calculé les concentrations internes de sucrose et éventuellement d'agarose, à l'aide du logiciel de traitement de données KALEIDAGRAPH, en supposant l'absence de fuite de sucrose, respectivement de glucose, vers l'extérieur, respectivement l'intérieur, de la vésicule.

²⁶ logiciel libre d'accès à l'adresse <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>

III Résultats : Dégonflement de vésicules phospholipidiques : comparaison entre vésicules remplies d'une solution aqueuse et vésicules remplies de gel d'agarose

Pour étudier l'effet de la présence d'un gel d'agarose dans des vésicules soumises à un dégonflement par choc osmotique, nous avons réalisé les mêmes expériences de dégonflement sur des vésicules remplies d'une solution aqueuse de sucrose et sur des vésicules remplies de gel d'agarose.

3.1 Dégonflement de vésicules remplies d'une solution aqueuse

Nous avons d'abord observé le comportement de vésicules remplies d'une solution de sucrose de concentration 50 mM et soumises à l'augmentation de la concentration de glucose de la solution externe. Deux types d'expériences ont été réalisées :

- 1) le dégonflement progressif (« lent ») est induit par l'augmentation étape par étape de la concentration de la solution extérieure de glucose (pour atteindre une concentration extérieure finale de glucose de 162 mM)
- 2) le dégonflement rapide par l'addition brutale d'une solution de glucose de concentration 400 mM au-dessus de la membrane anodisc (voir Figure 2_11), ce qui donne une concentration finale de glucose autour des vésicules de 330 mM après équilibrage du gradient de concentration et donc un choc osmotique de 280 mM.

3.1.1 Dégonflement progressif étape par étape (ou dégonflement lent)

J'ai suivi la totalité du processus de dégonflement de plusieurs vésicules (durant 5 heures). Au départ, les vésicules ont des formes quasi-sphériques, puis soumises au choc osmotique, elles se déforment généralement fortement avec le temps. Le bourgeonnement et/ou la division de vésicules dégonflées en deux plus petites vésicules filles (parfois sphériques) ont souvent été observés.

Une vésicule a maintenu une forme sphérique pendant son dégonflement et son rayon a décréu progressivement de 25 à 17 μm , ce qui correspond à une perte d'environ 50 % de la surface de la vésicule. Cette réduction du rayon correspond à une réduction de deux tiers du volume initial. Le film enregistré a permis de déterminer le volume de la vésicule à chaque étape. Ainsi, en faisant l'hypothèse que le nombre de molécules de sucrose présentes à l'intérieur de la vésicule était constant, la concentration de sucrose de la solution intérieure et la pression osmotique correspondante ont pu être mesurées à chacune des étapes du dégonflement (Fig. 3_1). Comme cela apparaît clairement, les pressions osmotiques à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule sont égales, ce qui montre que l'équilibre osmotique est atteint à la fin de chaque étape de dégonflement.

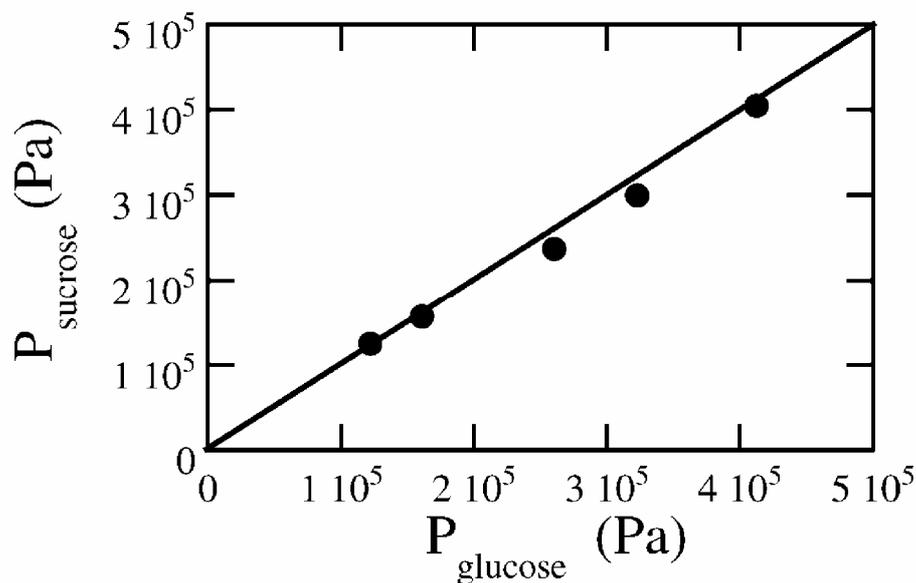


Figure 3_1: Pression osmotique intérieure (due au sucrose) fonction de la pression extérieure (due au glucose). A la fin de chaque étape du dégonflement progressif d'une vésicule aqueuse, ces deux pressions sont égales : l'équilibre osmotique est atteint.

Une grande variété de formes a été obtenue dans la chambre d'expérimentation à la fin du processus de dégonflement : ellipsoïdes, haltères, stomatocytes, discocytes, poires, étoiles, etc (Fig. 3_2).

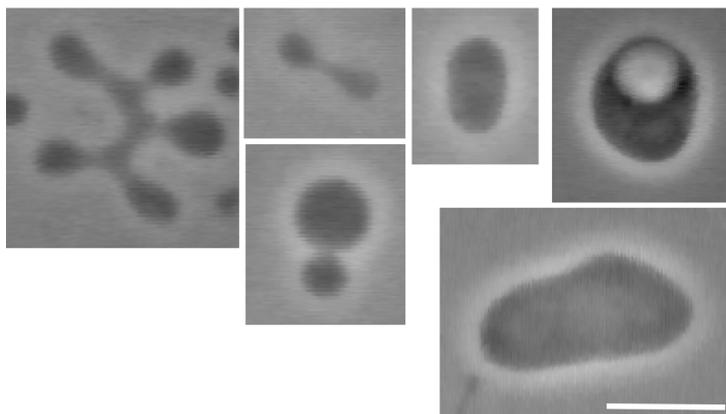


Figure 3_2: Variété de formes obtenues dans la chambre d'expérimentation à la fin du processus de dégonflement progressif de vésicules aqueuses (la barre vaut 5 μm).

3.1.2 Dégonflement rapide

Beaucoup de vésicules ont été photographiées à la fin du processus de dégonflement rapide et trois vésicules ont été filmées durant le processus complet (2 heures). Des divisions se sont produites dans deux de ces trois vésicules. La troisième est restée sphérique et j'ai ainsi pu quantifier son dégonflement sous un choc osmotique de 280 mM (voir la cinétique de dégonflement (ligne pointillée) dans la Figure 3_8). Comme pour le dégonflement lent étape par étape, les vésicules ont généralement été beaucoup déformées par rapport à leur forme sphérique initiale et j'ai observé de nombreuses formes différentes. Cependant, une majorité de vésicules ont été déformées à petite échelle et deux types de déformations ressortent :

- 1) la formation de nombreuses petites invaginations des membranes pointant vers l'intérieur des vésicules qui ressemblent alors à des framboises
- 2) la formation de colliers de perles lipidiques (Fig. 3_3).

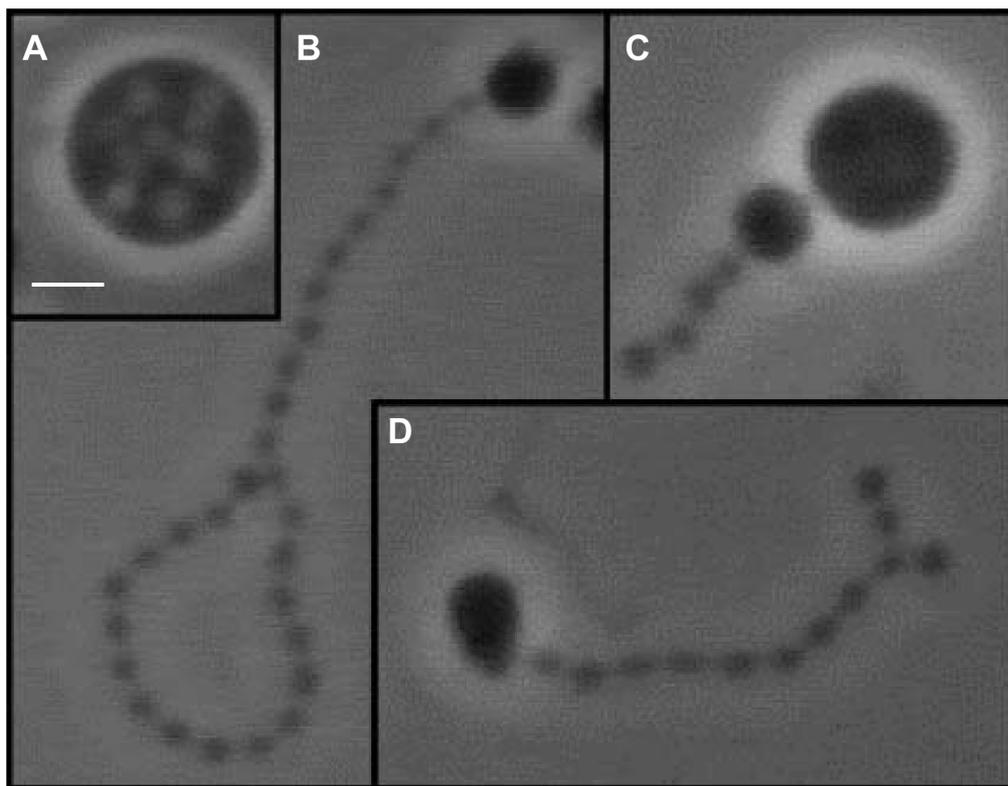


Figure 3_3: Lors du dégonflement rapide de vésicules aqueuses, on obtient majoritairement (A) des framboises (la barre vaut 5 μ m) et (B, C et D) des colliers de perles lipidiques.

3.2 Dégonflement de vésicules remplies de gel d'agarose

Avant de les dégonfler, les vésicules remplies d'un gel d'agarose et d'une solution de sucrose (de concentration 20 mM) sont diluées dans une solution iso-osmolaire de glucose. Elles sont observées en microscopie de contraste de phase à température ambiante et dans ces conditions, apparaissent légèrement marbrées et présentent des formes sphériques ou quasi-sphériques avec des rayons compris entre 10 et 35 μm (Fig. 3_4). Avec certaines vésicules, les fluctuations thermiques sont visibles en fort grossissement de 60x, ce qui suggère une faible interaction entre le gel et la membrane.

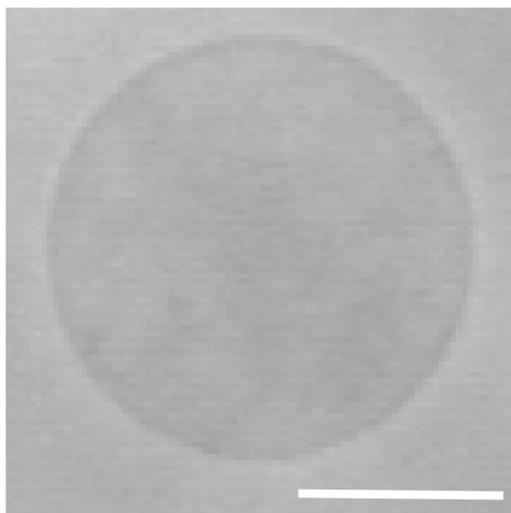


Figure 3_4: Une vésicule remplie d'un gel d'agarose et d'une solution de sucrose (de concentration 20 mM) est placée dans une solution iso-osmolaire de glucose. Image en microscopie de contraste de phase à température ambiante. La vésicule apparaît légèrement marbrée et présente une forme sphérique. La barre vaut 15 μm .

3.2.1 Dégonflement progressif étape par étape

J'ai enregistré le processus de dégonflement étape par étape de plusieurs vésicules préparées avec des concentrations initiales d'agarose de 0,18 % w/w, 0,36 % w/w et 1 % w/w. Les vésicules sont initialement diluées dans une solution de glucose de 20 mM. Puis, la concentration de glucose est augmentée en ajoutant, au-dessus de la membrane anodisc, une solution plus concentrée de glucose en trois ou quatre étapes, chaque étape durant au moins 40 minutes, de manière à obtenir une concentration finale de glucose comprise entre 90 et 154 mM. Dans une expérience typique, la concentration extérieure de glucose est à chaque étape successive égale à 20 ; 35 ; 56,6 ; 117,5 et 154 mM respectivement.

A chaque étape du dégonflement, il a fallu quantifier le volume V des vésicules observées. Ces vésicules, contrairement à des vésicules sphériques, peuvent prendre des formes assez compliquées. Pour quantifier le volume, nous avons toujours répété la procédure

suivante. D'abord, nous avons déterminé le contour de la vésicule, puis avons trouvé le centre de masse de ce contour. A partir de ce centre de masse, 36 rayons obtenus par rotations successives de 10° ont été mesurés (distance du centre de masse au contour) et leur moyenne a fourni un rayon moyen de la vésicule. Nous avons ensuite calculé le volume de la vésicule comme étant celui de la sphère équivalente, en faisant l'hypothèse de formes axisymétriques. Bien que les barres d'erreur soient probablement élevées pour les vésicules les plus déformées, ce calcul donne le bon ordre de grandeur pour les volumes. A partir de cette évaluation du volume, nous avons calculé les concentrations d'agarose et de sucrose en supposant l'absence de fuite de sucrose, respectivement de glucose, vers l'extérieur, respectivement l'intérieur, de la vésicule.

Les variations de la concentration de sucrose, c_s , dans les vésicules, en fonction de la concentration extérieure de glucose, c_g , sont montrées dans la Figure 3_5. La ligne droite rajoutée correspond à la courbe $c_s = c_g$. On remarque que tous les points de mesure se situent sous cette courbe, ce qui met en évidence que la concentration de sucrose intérieure est toujours inférieure à la concentration de glucose extérieure. Ces résultats sont donc clairement différents de ceux obtenus avec des vésicules remplies d'une solution aqueuse (données de la Figure 3_1) pour lesquelles les concentrations de sucrose intérieure et de glucose extérieure, c'est-à-dire les pressions osmotiques intérieure et extérieure s'égalisent.

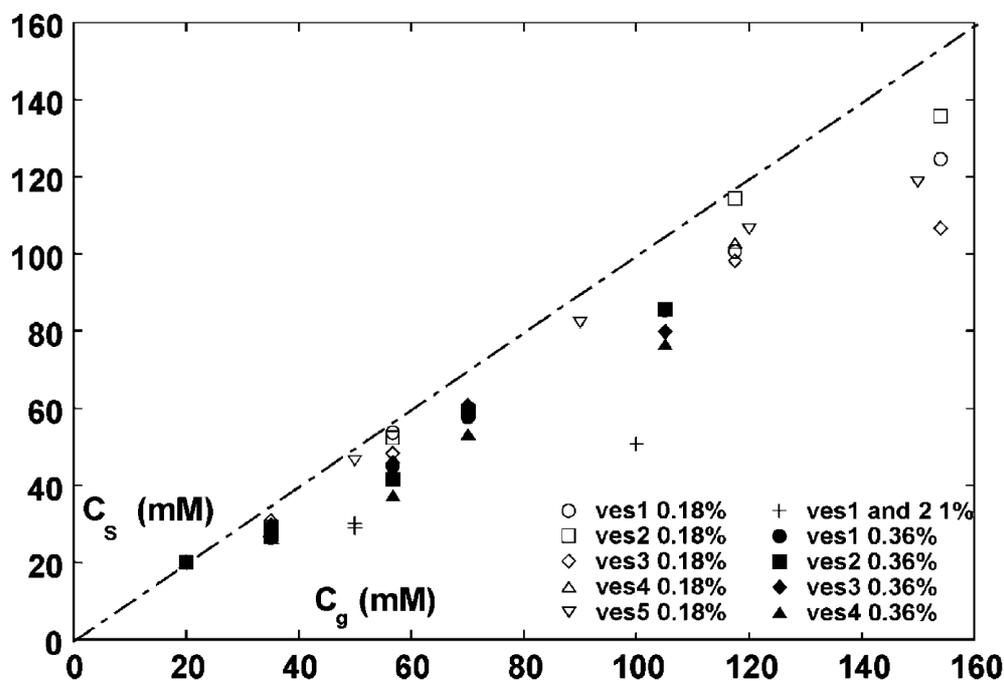


Figure 3_5: Variations de la concentration de sucrose, c_s , en fonction de la concentration extérieure de glucose, c_g pour des vésicules remplies d'un gel d'agarose. La droite en pointillés correspond à la droite $y = x$.

De plus, il est possible de regarder la dépendance de $c_g - c_s$ en fonction de la concentration initiale de gel, c_{aga}^0 , pour une valeur déterminée de la concentration extérieure de glucose. C'est ce qui est fait dans la Figure 3_6 pour deux valeurs de la concentration externe de glucose (50 et 100 mM). Il apparaît clairement que cette différence $c_g - c_s$ due à la présence du gel d'agarose est d'autant plus grande que la concentration initiale de gel et la concentration extérieure de glucose sont grandes.

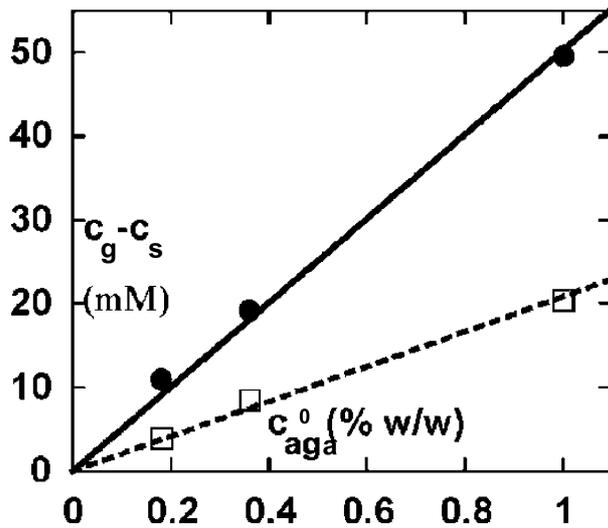


Figure 3_6: Dépendance de $c_g - c_s$ en fonction de la concentration initiale de gel, c_{aga}^0 , pour une valeur déterminée de la concentration extérieure de glucose. Carrés creux pour $c_g = 50$ mM, cercles pleins pour $c_g = 100$ mM. Courbe en pointillée : fit des points pour $c_g = 50$ mM et courbe pleine : fit des points pour $c_g = 100$ mM.

Un aspect important lors du dégonflement de vésicules remplies de gel est que ces vésicules n'expérimentent jamais de fission, contrairement aux vésicules remplies de solution aqueuse. D'un point de vue des morphologies observées, il est à noter que les ratios de dégonflement V_0/V les plus grands sont obtenus pour les concentrations initiales de gel les plus faibles (Fig. 3_7).

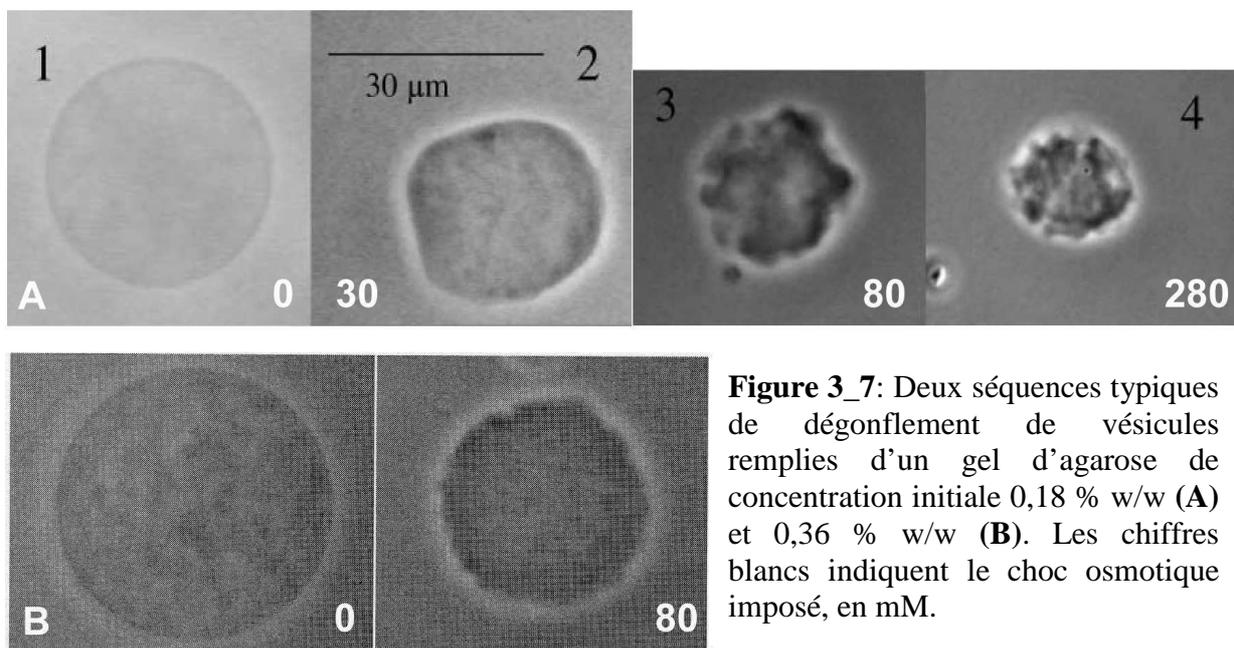


Figure 3_7: Deux séquences typiques de dégonflement de vésicules remplies d'un gel d'agarose de concentration initiale 0,18 % w/w (A) et 0,36 % w/w (B). Les chiffres blancs indiquent le choc osmotique imposé, en mM.

Des formes irrégulières sont observées lorsque la concentration extérieure de glucose augmente. Au début du processus, pour des concentrations extérieures de glucose modérées, de faibles dégonflements sont observés et les vésicules restent quasi-sphériques. Puis, lorsque la concentration de glucose augmente, des instabilités de forme sont observées. En particulier, les vésicules préparées avec une concentration d'agarose de 0,18 % w/w présentent des facettes (Fig. 3_7_A_2). Pour des concentrations extérieures de glucose encore plus grandes, ces vésicules se dégonflent fortement et présentent des formes très irrégulières avec apparition de bosses et de pics, comme montré pour une vésicule (Figs 3_7_A_3 et 4). Les vésicules préparées avec une concentration initiale d'agarose de 0,36 ou 1 % w/w se dégonflent moins et présentent des déformations à plus petite échelle (Fig. 3_7_B). Les tailles typiques des bosses et des pics sont comprises entre 0,5 et 3 μm , les pics les plus grands étant obtenus sur les vésicules les plus déformées (concentration initiale du gel d'agarose de 0,18 % w/w). Les déformations sont plus petites quand le module élastique du gel est plus grand (0,36 et 1 % w/w). Les distances caractéristiques entre pics adjacents sont comprises entre 1 et 8 μm .

3.2.2 Dégonflement rapide

L'effet d'un dégonflement rapide a été étudié sur des vésicules préparées avec un gel d'agarose de concentration initiale 0,07 % w/w. Trois méthodes ont été utilisées pour dégonfler les vésicules.

Dans la première méthode, les vésicules sont directement plongées dans une solution de glucose hyper-osmolaire. L'observation ne peut commencer que lorsque les vésicules ont sédimenté en bas de la chambre, c'est-à-dire environ après 10 minutes. Si le choc osmotique est important, les vésicules sont alors déjà très déformées lorsque l'expérimentateur commence à les observer. Elles présentent de larges pics de tailles bien définies.

Dans la deuxième méthode, nous avons utilisé une grande chambre avec une surface libre de liquide, dans laquelle une solution de glucose concentrée est doucement injectée près des vésicules. Le dégonflement de vésicules peut alors être enregistré dès le début du processus. Lors du dégonflement, il est arrivé que la membrane se sépare du gel et fasse des fils et des colliers lipidiques. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de rediluer la solution externe en injectant de l'eau pure. Dans ce cas, les vésicules, précédemment dégonflées, gonflent et les pics disparaissent. Le processus de dégonflement est réversible à condition que les déformations obtenues lors du maximum de dégonflement ne soient pas trop

importantes. Lorsque la réduction de volume atteint environ 80 % du volume initial, une faible déformation persiste, ce qui indique l'existence d'un régime plastique.

Dans une troisième méthode, j'ai procédé comme j'avais fait avec les vésicules remplies d'une solution aqueuse de sucre et avec les vésicules remplies de gel lentement dégonflées. Cette méthode m'a permis d'observer les cinétiques de dégonflement de quatre vésicules remplies d'un gel de concentration 0,07 % w/w. Les concentrations finales de la solution extérieure de glucose étaient soit 324 mM (pour trois vésicules ; ce qui correspond donc à un choc osmotique de 304 mM), soit 404 mM (pour une vésicule ; ce qui correspond donc à un choc osmotique de 384 mM). Ces cinétiques sont montrées dans la Figure 3_8. Il apparaît que ces quatre courbes de dégonflement présentent la même pente pendant les 300 premières secondes, et que cette pente commune est égale à celle observée pour la vésicule sans gel et dégonflée rapidement (ligne pointillée).

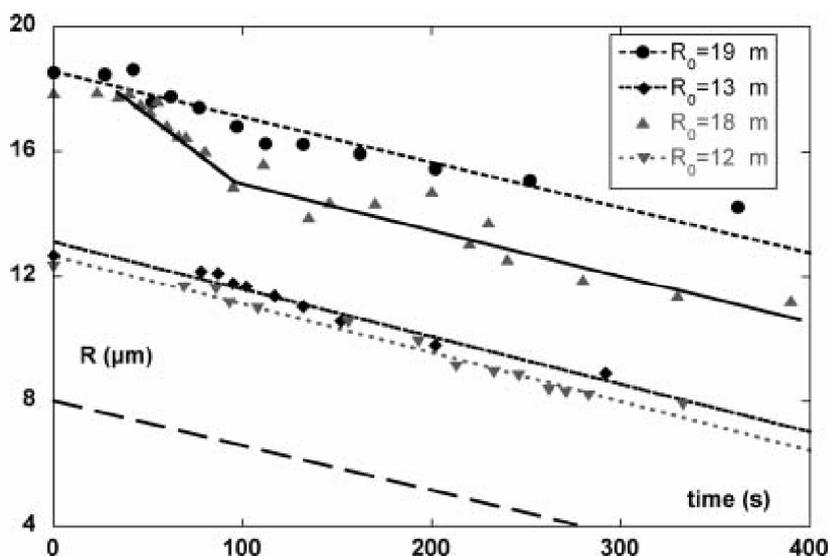


Figure 3_8: cinétiques de dégonflement rapide de quatre vésicules remplies d'un gel de concentration initiale 0,07 % w/w et d'une vésicule sans gel également dégonflée rapidement (ligne pointillée).

Du point de vue des morphologies, les vésicules remplies d'un gel de concentration initiale 0,07 % w/w sont très déformées à la fin du processus de dégonflement. Des formes typiques sont montrées dans la Figure 3_9. Comme observé dans le cas du dégonflement lent de vésicules avec un gel de concentration initiale 0,18 % w/w, les vésicules initialement sphériques montrent progressivement des facettes (pour une réduction de volume d'environ 10-15 %). Les pics apparaissent pour des réductions de volume plus importantes. La réduction maximale de volume est similaire à celle observée avec des vésicules remplies de gel de concentration initiale 0,18 % w/w, c'est-à-dire de l'ordre de 80 %. Dans ces conditions, des pics prononcés sont clairement visibles.

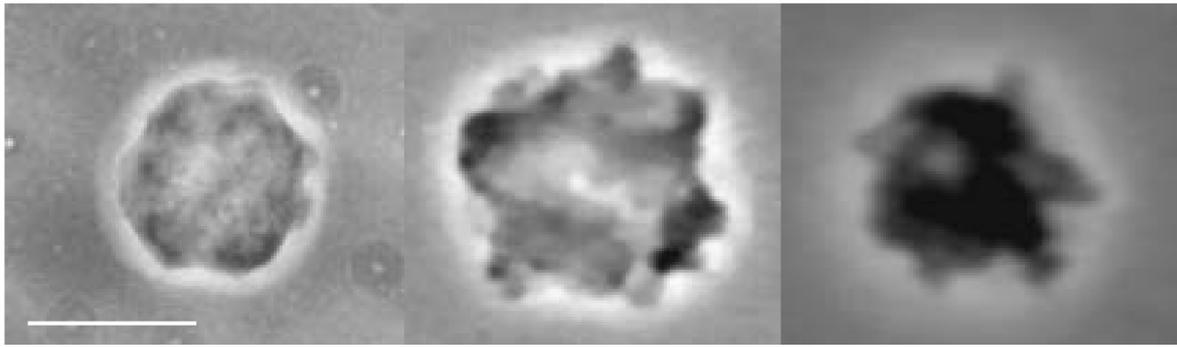


Figure 3_9: Formes typiques observées avec des vésicules remplies d'un gel d'agarose de concentration initiale 0,07 % w/w et soumises à un choc osmotique rapide (la barre vaut 10 μm).

IV Discussion

4.1 Dégonflement de vésicules remplies d'une solution aqueuse

4.1.1 Fragilité des vésicules remplies d'une solution aqueuse

Comme nous l'avons vu, les vésicules géantes remplies d'une solution aqueuse sont des objets très fragiles qui souvent bourgeonnent ou se divisent en plusieurs vésicules filles lors de leur dégonflement lent ou rapide.

4.1.2 Perte de lipides lors du dégonflement

Lors de l'application de chaque type de choc hyper-osmotique (progressif ou rapide), j'ai pu suivre le dégonflement complet d'une vésicule qui a gardé une forme sphérique. Lorsqu'une vésicule se dégonfle, sa surface devient largement en excès, ce qui explique pourquoi il est habituel de la voir se scinder en plusieurs vésicules filles. Avec ces deux vésicules, cela n'a pas été observé alors que la réduction de leur volume correspondait à une réduction d'environ 50 % de leur surface. En fait, le même comportement a déjà été observé par Boroske et al. (1981) en soumettant une vésicule à un choc osmotique bien plus faible, et également par Sandre et al. (1999) avec des vésicules de DOPC (marquées par une sonde fluorescente qui se lie à la membrane) et soumises à une illumination importante et continue. Dans ces deux expériences, la réduction de la surface de la vésicule était interprétée comme une perte de lipides de la membrane. Sandre et al., utilisant la fluorescence du marqueur lié à la membrane, constatèrent la présence de petites particules fluorescentes à côté des vésicules dégonflées et les interprétèrent en termes de superstructures lipidiques concentrées (phase cubique bicontinue ; Kummrow and Helfrich, 1996 ; Klösgen and Helfrich, 1997), formées en conséquence de l'effondrement de l'excès de membrane. Ces puits de lipides pourraient expliquer le comportement observé dans notre cas, la transition étant probablement déclenchée par l'application de la pression osmotique extérieure, étant donné qu'il n'a été observé, en microscopie de contraste de phase, ni de bourgeonnement, ni la formation de vésicules filles.

4.1.3 Equilibre osmotique et théorie ADE dans le cas du dégonflement progressif

Les vésicules dont nous venons de parler permettent de vérifier le comportement habituel observé lors du dégonflement d'une vésicule remplie de solution aqueuse : la vésicule atteint l'équilibre osmotique, c'est-à-dire que les pressions osmotiques intérieure et extérieure (calculées ici à partir des concentrations de sucrose interne et de glucose externe) s'égalisent pour devenir égales à la fin du dégonflement (Fig. 3_1 ; Boroske et al., 1981).

Lorsque l'on observe une chambre entière à la fin du processus de dégonflement progressif, on obtient une grande variété de formes : ellipsoïdes, haltères, stomatocytes, discocytes, poires, étoiles, vésicules avec une grosse invagination intérieure ou un bourgeonnement extérieur, etc... Ces formes sont typiques des morphologies prédites par le modèle ADE (Area Difference Elasticity ; Mui et al., 1995) en fonction du volume réduit et de la différence d'aire réduite effective. Une telle variété de formes a déjà été obtenue expérimentalement quand la différence d'aires entre les couches était contrôlée par la température (Käs and Sackmann, 1991 ; Döbereiner et al., 1993). Dans notre cas, nous avons observé, en même temps et dans la même chambre, des formes de vésicules correspondant à toute la gamme de volumes réduits et toute la gamme des différences d'aires entre les couches (Fig. 4_1). Ceci s'explique probablement du fait de la fission non contrôlée des vésicules et de l'asymétrie entre les deux couches des membranes, asymétrie qui varie d'une vésicule à l'autre à l'intérieur d'une même préparation.

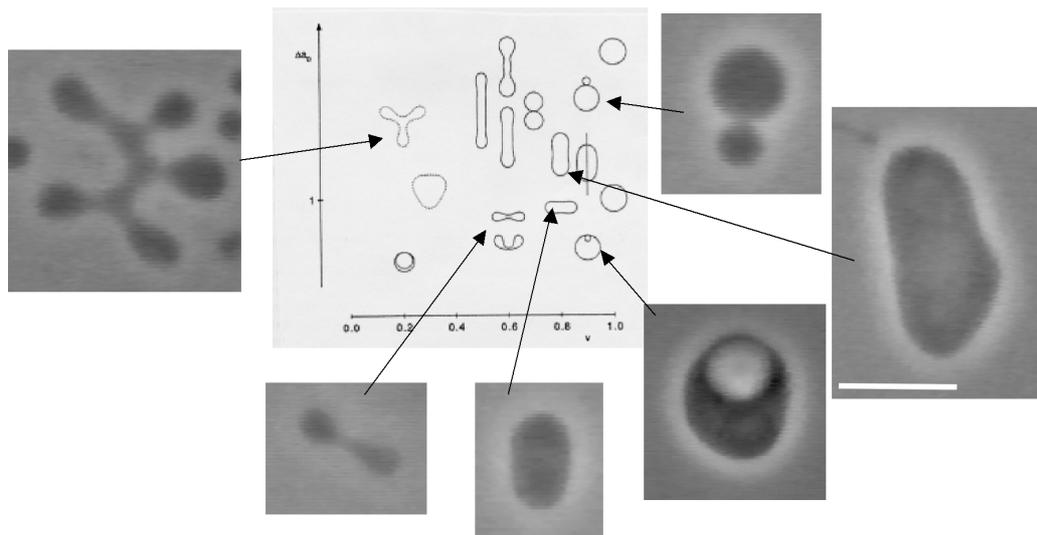


Figure 4_1: Variété de morphologies de vésicules obtenues lors du dégonflement lent de vésicules aqueuses. En même temps et dans la même chambre, une multitude de formes de vésicules sont observées, correspondant aux formes prédites par le modèle ADE (diagramme de phase au centre tiré de Mui et al., 1995) dans toute la gamme des volumes réduits et toute la gamme des différences d'aires réduites effectives entre les couches. La barre vaut 5 μm .

4.1.4 Morphologies particulières lors du dégonflement rapide : effet framboise et effet perle

Dans le cas du dégonflement rapide, les observations sont globalement les mêmes (présence de vésicules très dégonflées, variété des formes obtenues), mais deux types de morphologies apparaissent dorénavant majoritairement, alors qu'elles n'apparaissent quasi pas lors du dégonflement lent. Il s'agit :

- 1) de la formation de nombreuses petites invaginations pointant vers l'intérieur des vésicules et qui leur confèrent un aspect de framboise (Fig. 3_3_A). Ceci a déjà été observé par Anne-Laure Bernard (1999) et cette dernière a qualifié ce processus d'effet framboise. Il n'apparaît que dans le cas d'un dégonflement rapide avec un choc osmotique important.
- 2) de la formation de « colliers de perles » lipidiques (Fig. 3_3_B, C et D). La formation de ces colliers est probablement favorisée par l'apparition de faibles courants induits par l'addition d'un volume important de solution de glucose très concentrée dans la chambre d'observation. A cause de ces courants, il arrive que l'arrière des vésicules s'allonge au contact du substrat (Abkarian et al., 2002), provoquant une déstabilisation locale de la membrane, probablement à l'origine de ces colliers.

4.2 Dégonflement de vésicules remplies de gel

4.2.1 Le gel confère une résistance à la déformation

Un aspect fondamental des vésicules remplies de gel est qu'elles acquièrent, grâce au gel, une résistance à la déformation : lors de leur dégonflement (lent ou rapide), elles ne se divisent jamais en vésicules filles et gardent leur unité structurale. Examinons maintenant plus en détails le rôle du gel d'agarose lors du dégonflement dû à un choc osmotique.

4.2.2 Effet de rétention d'eau par le gel. La pression élastique du gel varie comme le carré de la concentration de gel

Le deuxième effet important de la présence du gel est que, contrairement au cas des vésicules remplies d'une solution aqueuse, l'égalité entre la concentration interne de sucrose

et la concentration externe de glucose à la fin de chaque étape de dégonflement n'est plus vérifiée (Fig. 3_5). Sur cette Figure, il apparaît clairement que la concentration de glucose externe est toujours supérieure à la concentration intérieure de sucrose, et ce quelque soit la concentration de gel utilisée (de 0,18 à 1 % w/w). Ce résultat montre que, sous la même pression extérieure, la concentration intérieure de sucrose des vésicules remplies de gel est inférieure à celle des vésicules remplies d'une solution aqueuse. Ceci veut dire que le gel retient l'eau à l'intérieur de la vésicule. Pour illustrer cet effet de rétention d'eau par le gel, on peut tracer la variation de la différence $c_g - c_s$ en fonction de la concentration initiale de gel d'agarose, c_{aga}^0 , pour une valeur fixée de la concentration externe de glucose. C'est ce qui est fait dans la Figure 3_6 pour deux valeurs de la concentration extérieure de glucose ($c_g = 50$ et 100 mM). Ces deux courbes permettent de faire deux observations :

- 1) l'effet de rétention d'eau par le gel (quantifié par $c_g - c_s$) est d'autant plus grand que la concentration initiale d'agarose est grande.
- 2) l'effet de rétention d'eau par le gel est d'autant plus grand que la pression exercée sur les vésicules (quantifiée par c_g) est grande.

Pour mieux comprendre l'origine de cet effet, examinons les différentes contributions physiques aux pressions osmotiques exercées d'une part, par la solution extérieure de glucose, P_{glu} et, d'autre part, par le mélange intérieur de la vésicule, P_{gel} . Ces deux pressions osmotiques sont, par définition de l'état d'équilibre, égales à l'équilibre. P_{glu} étant simplement proportionnelle à la concentration extérieure de glucose, intéressons-nous à P_{gel} .

Comme nous l'avons vu dans la partie *Introduction*, la pression P_{gel} , associée au mélange du solvant avec le réseau de polymères, est proportionnelle à la dérivée par rapport au nombre de molécules de solvant de l'énergie libre totale du système solvant/polymères. Cette énergie libre totale s'écrit pour les gels gonflés comme la somme d'une énergie libre de mélange, qui prend en compte les interactions osmotiques dues au mélange des molécules de solvant avec les chaînes polymères non réticulées, et d'une énergie libre élastique qui prend en compte la déformation du réseau réticulé de polymères initialement isotrope. Cette réponse élastique à la déformation implique des réarrangements du réseau à grande échelle supérieure à la taille de la maille (Flory, 1953 ; Dusek and Prins, 1969 ; Mark and Erman, 1988). Ainsi, pour les gels classiques les plus simples (chaînes longues et flexibles, déformation des chaînes proportionnelle à la contrainte macroscopique), la pression exercée par un gel gonflé s'écrit :

$$P_{gel} = P_{sol} + P_{el},$$

où P_{sol} correspond à l'énergie libre de mélange et est donc la pression osmotique du mélange solvant/chaînes polymères non réticulées et P_{el} est la pression élastique.

Dans le cas présent, le terme de mélange correspond à une solution ternaire avec l'eau, le sucrose et les chaînes d'agarose. Cependant, il a été montré que la contribution osmotique des chaînes d'agarose ne jouait pas de rôle significatif pour des gels d'agarose à l'équilibre gonflés dans l'eau (Rochas et al., 1996 ; 1997). Le terme de mélange est donc principalement déterminé par la contribution osmotique du sucrose, P_{suc} , si l'on suppose que les interactions entre le sucrose et les chaînes d'agarose sont faibles, ce qui est probablement le cas étant donné la faible concentration de sucrose utilisée (20 mM). De plus, Rochas et al. (1996) ont montré, lors d'expériences de dégonflement de gels d'agarose gonflés, que la pression élastique était égale au module de cisaillement du gel, G . En conséquence, à l'équilibre, il est possible d'écrire :

$$P_{glu} = P_{gel} = P_{sol} + P_{el} \approx P_{suc} + P_{el}$$

et $P_{el} = G$

ainsi $P_{glu} - P_{suc} \approx G$

La pression osmotique du glucose en solution dans l'eau est proportionnelle à la concentration de glucose de la solution extérieure, et la pression osmotique du sucrose dans l'eau est proportionnelle à la concentration de sucrose de la solution à l'intérieur de la vésicule. Ainsi, G est proportionnel à $c_g - c_s$. En conséquence, la quantité $c_g - c_s$, comme G , devrait dépendre, d'une part, des caractéristiques structurelles du réseau, comme la densité de réticulation qui est déterminée par la concentration initiale d'agarose, c_{aga}^0 , et d'autre part, de l'état de déformation du réseau comparativement à l'état initial de repos, déformation due au dégonflement, et que l'on peut donc caractériser par le ratio V_0/V .

En traçant la variation de $c_g - c_s$ en fonction de ces deux paramètres, plus précisément en fonction de leur produit, on observe, à l'aide d'une représentation double logarithmique (Fig. 4_2), que les données tombent raisonnablement bien sur une courbe unique (droite) de variation de $c_g - c_s$ en fonction de la concentration d'agarose dans la vésicule, c_{aga} ($c_{aga} = c_{aga}^0 \times V_0/V$), avec une pente égale à 2. Ce résultat montre que la réponse élastique du gel varie, dans la gamme de pressions extérieures testées, avec le carré de la concentration du gel, c_{aga}^2 .

Ces propriétés de dégonflement particulières aux vésicules avec gel tirent leur origine des propriétés mécaniques et structurelles du réseau d'agarose. L'effet du gel ne peut pas être interprété comme une simple contribution osmotique, mais résulte de la pression élastique exercée par le gel. Cet effet ne dépend pas de la concentration initiale du gel, mais uniquement de la concentration du gel, $c_{aga} = c_{aga}^0 \times V_0/V$ (courbe unique de la Figure 4_2).

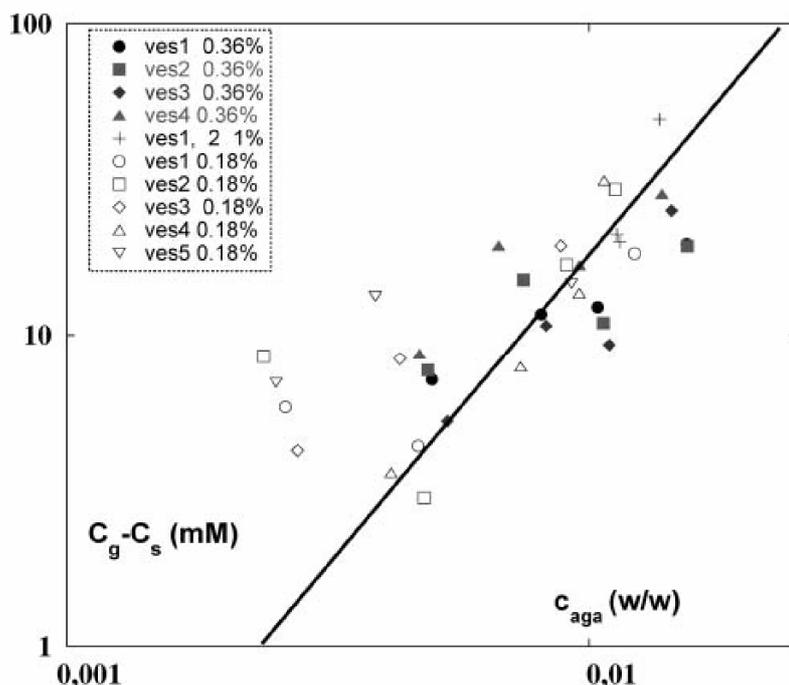


Figure 4_2: $c_g - c_s$ (grandeur proportionnelle au module élastique de cisaillement) en fonction de la concentration instantanée d'agarose.

De telles lois de puissance avec des exposants proches de 2 ont déjà été trouvées avec plusieurs biopolymères, pour des concentrations de polymères fixes et égales aux concentrations de préparation (Normand et al., 2000). Dans notre cas, il faut bien voir que la concentration du gel d'agarose n'est pas constante et n'est donc pas celle de formation du gel, puisqu'elle résulte du dégonflement du gel, dont l'effet sur la réorganisation de la structure du gel n'est pas connu. Pour des pressions extérieures faibles, quasi aucune déformation du gel n'apparaît, mais pour des pressions extérieures élevées, la réduction maximale de volume que nous avons observée est de l'ordre de 80 %, le gel est alors très déformé et sa concentration est alors très différente de sa concentration initiale.

4.2.3 La cinétique de dégonflement de vésicules remplies de gel d'agarose n'est pas affectée par la présence du gel

J'ai aussi réalisé des expériences de dégonflement rapide sur des vésicules remplies de gel d'agarose de concentration initiale égale à 0,07 % w/w. En utilisant la chambre permettant d'observer le processus complet de dégonflement, j'ai pu quantifier les cinétiques pour 4 vésicules. Comme nous l'avons vu dans la Figure 3_8, les 4 courbes montrent la même pente, pendant les 300 premières secondes, que celle obtenue pour la vésicule remplie d'une solution

aqueuse. Il semble donc que la présence d'un gel d'agarose ne change pas la dynamique de dégonflement d'une vésicule.

Pour mieux comprendre ce point, intéressons-nous aux échelles de temps qui rentrent en jeu dans le processus de dégonflement. En ce qui concerne le gel, la cinétique de dégonflement de gels classiques est généralement considérée comme contrôlée par le coefficient de diffusion collective (ou coopérative), D , et par la taille du gel (Tanaka and Fillmore, 1979 ; Matsuo and Tanaka, 1992). Le temps caractéristique, τ , associé au dégonflement d'un gel s'écrit alors comme :

$$\tau = R^2/\pi^2 D,$$

où R est le rayon du gel.

Dans notre cas, la taille typique des gels d'agarose donne $R = 10 \mu\text{m}$ et en considérant un coefficient de diffusion collective aussi petit que $10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, cela donne un temps caractéristique de l'ordre de 1 seconde. Ce temps est donc très court comparé aux temps de dégonflement observés dans la Figure 3_8. De plus, les gels d'agarose sont constitués d'une matrice rigide dans laquelle les chaînes de polymères ne sont pas mobiles. En conséquence, en ce qui concerne les propriétés de transport, le gel se comporte probablement comme un matériau poreux dont la maille est beaucoup plus grande que la taille des molécules d'eau, de telle manière que la diffusion de l'eau dans le gel est probablement de l'ordre de la diffusion de l'eau en volume ($10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$). En conséquence, la pression élastique du gel n'affecte pas la cinétique de dégonflement. Le dégonflement d'une vésicule remplie d'un gel d'agarose est ainsi probablement contrôlé uniquement par le transport de l'eau à travers la membrane et s'apparente donc au dégonflement d'une vésicule remplie d'une solution aqueuse.

En conclusion, le gel n'affecte pas la cinétique du dégonflement (par exemple, en la ralentissant) mais arrête précocement le dégonflement du fait de la rétention d'eau.

4.2.4 L'apparition de cratères

Parmi ces quatre vésicules remplies d'un gel de concentration initiale 0,07 % w/w, une vésicule montre un dégonflement plus rapide pendant une période d'environ une minute (Fig. 3_8). Ce dégonflement rapide est associé à l'apparition d'une forme de « cratère » dans la région supérieure de la vésicule puis dans d'autres régions (Fig. 4_3). Je n'ai pas d'explication solide en ce qui concerne ce cratère. Cependant, il est peu probable que ce cratère soit associé à un simple pore avec éjection de solution sucrée hors de la vésicule. En effet, plusieurs arguments s'opposent à cette explication : (i) en solution aqueuse, la durée de

vie moyenne d'un pore est d'environ 200 ms (Tekle et al., 2001 ; Karatekin et al., 2003), (ii) cela n'a aucun intérêt d'éjecter un volume de solution eau/sucrose hors de la vésicule à travers un pore transitoire puisque cela ne change rien en ce qui concerne la concentration interne de sucrose, (iii) la vésicule a déjà légèrement commencé son processus de dégonflement et a donc, normalement, un excès de membrane. La tension membranaire est donc à priori nulle. Or, pour qu'un pore apparaisse avec éjection de liquide interne vers l'extérieur, la membrane doit être tendue. Cela est par exemple réalisé en faisant adhérer la vésicule au substrat (Bernard et al., 2000; Karatekin et al., 2003) ou en illuminant de manière intense la vésicule (Sandre et al., 1999). L'ouverture d'un pore et l'éjection de liquide interne permettent alors de relaxer la tension membranaire.

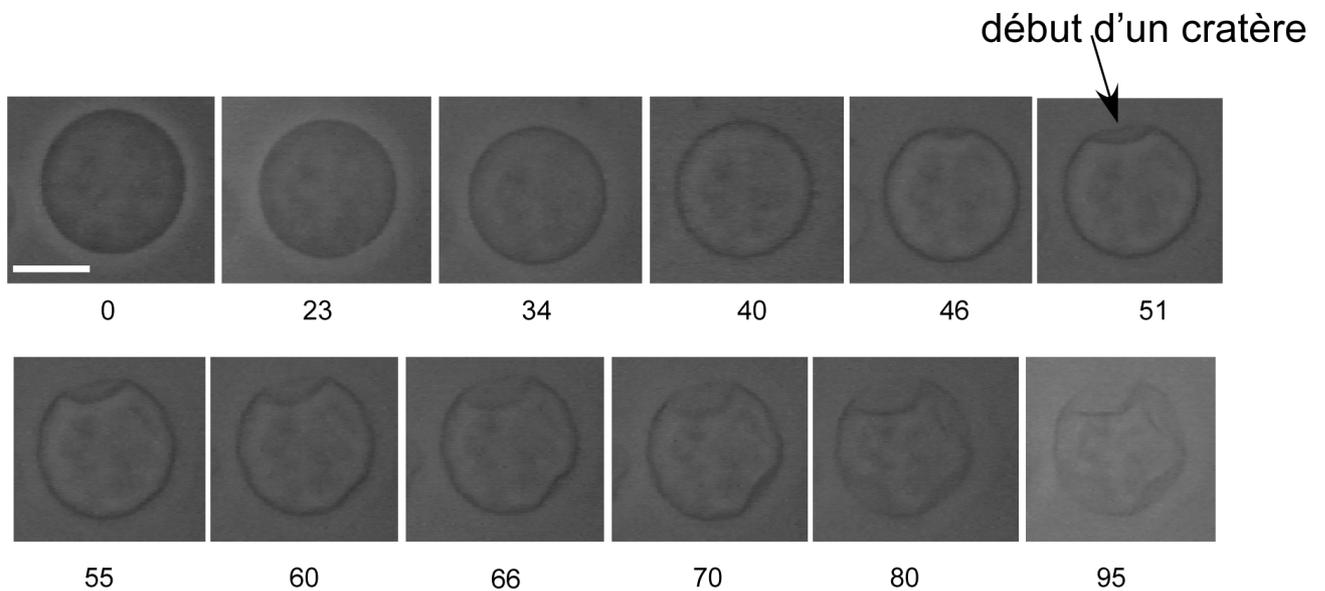


Figure 4_3: Le dégonflement plus rapide et transitoire au début du dégonflement d'une vésicule (cinétique avec triangles et support en ligne pleine de la Figure 3_8) est associé à une morphologie de type « cratère ». Nous lui avons donné ce nom du fait de l'impression de creux au niveau du cratère. Le temps est indiqué en secondes. La barre vaut 10 μm .

L'éjection de liquide vers l'extérieur dans notre expérience de dégonflement ne peut donc apparaître que dans le cas où le processus de transport de l'eau à travers la membrane est saturé du fait de l'intensité du choc osmotique (choc de plus de 300 mM). Une telle saturation a déjà été rapportée par Sten-Knudsen (1978). Dans ce cas, le processus de perméabilité à travers la membrane étant saturé, la membrane peut être maintenue tendue du fait de l'acquisition, induite par la pression extérieure, d'une forme non sphérique (ratio aire/volume plus grand). Ainsi l'excès de pression osmotique (excès de pression au-delà de la pression provoquant la saturation) peut provoquer l'éclatement de la vésicule, qui s'apparente alors à une membrane imperméable, trop tendue et qui expulse violemment du liquide vers l'extérieur. La formation de ces cratères serait donc associée à l'éclatement (temporaire,

puisque le système continue de se dégonfler) de la membrane, qui, après relaxation de sa tension membranaire, se refermerait sur le gel. Il s'agirait donc d'une forme de pore associée à la saturation du phénomène de perméabilité à travers la membrane.

4.2.5 L'apparition de morphologies originales, ressemblance avec les échinocytes

Les formes de vésicules soumises à un dégonflement osmotique sont très différentes selon que les vésicules sont remplies de gel d'agarose ou d'une solution aqueuse, même si leurs cinétiques de dégonflement sont similaires et simplement déterminées par le transport de l'eau à travers la membrane. Contrairement à la pression élastique du gel qui ne dépend pas de la concentration initiale de gel, mais uniquement de la fraction volumique de ce dernier, les morphologies observées pour des vésicules remplies de gel, elles, dépendent de la concentration initiale du gel. Ainsi, les vésicules préparées avec une faible concentration d'agarose (0,07 et 0,18 % w/w), c'est-à-dire avec un gel de faible module élastique, montrent des instabilités de forme, avec des facettes (que l'on retrouve dans le cas de vésicules géantes supportées par un réseau de filaments d'actine et soumises à une variation de température (Boulbitch et al., 2000)), puis des bosses et pics bien définis typiquement de plusieurs microns. Les vésicules préparées avec des gels de plus forts modules élastiques (0,36 et 1 % w/w) présentent des déformations plus petites similaires à des rides d'environ un micron. Ces morphologies sont stables dans le temps.

Un aspect intéressant des vésicules avec des gels de faibles modules élastiques et dégonflées progressivement ou rapidement à l'aide d'un choc osmotique important est l'apparition de morphologies réminiscentes d'échinocytes qui sont les formes crénelées de globules rouges observées en quantité anormale dans le cas de certaines pathologies (Turchetti et al., 1997 ; voir Figures 1_20, 1_22 et 3_9).

L'apparition de morphologies a beaucoup été décrite dans la littérature dans des structures contenant des réseaux élastiques, comme des gels polymères ou des cellules. En ce qui concerne les matériaux polymères, des formes originales sont observées dans des gels lorsqu'ils subissent des transitions de phase volumique, par exemple en les chauffant ou en faisant varier la composition du solvant ou la pression osmotique (Matsuo and Tanaka, 1992). On peut, par exemple, observer des morphologies en forme de tige plus ou moins épaisse avec des régions alternativement gonflées ou dégonflées (Fig. 1_18). Ces formes sont souvent stables pendant plusieurs mois.

Au niveau cellulaire, les érythrocytes ont beaucoup été étudiés et il est connu (Ponder, 1948) qu'un certain nombre de stimuli extérieurs peuvent modifier la forme habituellement discoïde des globules rouges, ceci à volume et surface constants. Ces stimuli (variation de la teneur en sels, du pH, de la quantité de cholestérol dans la membrane, ...) peuvent provoquer l'apparition d'une série de formes crénelées, appelées échinocytes, ou alternativement l'apparition de formes concaves, appelées stomatocytes. On parle ainsi de la séquence stomatocyte-discocyte-échinocyte.

Cette séquence a théoriquement été décrite en prenant en compte les propriétés de la membrane composite, décrite comme l'association bi-dimensionnelle du réseau de spectrine élastique ancré dans la membrane plasmique (Lim et al., 2002 ; Mukhopadhyay et al., 2002 ; voir la partie *Introduction*). Ce modèle permet, pour des globules rouges, de retrouver les formes de la séquence stomatocyte-discocyte-échinocyte en faisant varier un seul paramètre qui est la différence d'aires relaxées entre les deux feuillettes ($\Delta A_o = A_o^{\text{ext}} - A_o^{\text{int}}$), les autres paramètres comme la surface et le volume restant constants. Ainsi, les résultats obtenus avec ce modèle de mécanique membranaire établissent la différence d'aires relaxées comme un paramètre dont les seules variations sont suffisantes pour suivre la séquence de formes d'hématies observées expérimentalement.

Par contre, ce modèle théorique n'explique pas comment un agent extérieur (chimique ou physique) agit sur le globule rouge et sa membrane composite. Ainsi, il n'est pas prouvé qu'en réalité, un globule rouge subit la séquence stomatocyte-discocyte-échinocyte du fait de l'action d'un agent qui ne modifie que la différence d'aires relaxées. De ce point de vue, les recherches biochimiques qui tentent de comprendre l'effet d'agents sur les globules rouges restent très qualitatives (Gimsa and Ried, 1995 ; Wong, 1999).

4.2.6 Hypothèse pour expliquer l'apparition de morphologies rappelant celles d'échinocytes avec les vésicules remplies de gel

Les vésicules remplies de gel de faible module élastique ressemblent très fortement à des échinocytes après dégonflement sous choc osmotique. Cependant, leur structure (interactions probablement faibles entre le gel et la membrane, gel tri-dimensionnel) et les conditions d'obtention de leurs morphologies crénelées (réduction de volume importante) sont très différentes de celles de globules rouges et le modèle évoqué plus haut et expliquant

l'apparition d'échinocytes pour les globules rouges ne peut s'appliquer au cas des vésicules remplies de gel d'agarose. Par exemple, si ce modèle s'appliquait, la taille typique des spicules, définie comme la racine carrée du rapport module de courbure de la membrane divisé par le module de cisaillement (Mukhopadhyay et al., 2002), devrait être de l'ordre du nanomètre dans notre système, ce qui n'est évidemment pas le cas.

L'apparition de morphologies particulières dans des gels polymères fortement dégonflés a été expliquée par Matsuo et Tanaka (1992) par la formation d'une couche dense imperméable à la surface du gel où le dégonflement commence. Cette étape est suivie par un changement de forme de cette surface, du fait de la flexibilité de la couche extérieure imperméable, ce qui engendre donc l'apparition de formes figées. Dans des expériences de dégonflement de gels d'agarose, une transition de phase entre un état isotrope et un état anisotrope a été observée sous l'effet d'une pression uniaxiale ou par séchage lent de la surface supérieure du gel. Dans la région supérieure du gel, un état dégonflé, biréfringent, et anisotrope en ce qui concerne ses propriétés élastiques se forme et coexiste en équilibre stable avec la phase gonflée et isotrope de la région inférieure (Rochas et al., 1996 ; 1997). Il est possible qu'un processus similaire ait lieu dans les vésicules remplies de gel d'agarose. Le dégonflement osmotique de ces vésicules pourrait provoquer la formation d'une couche de gel dense et imperméable au niveau de la surface de gel en contact avec la membrane, ce qui éventuellement bloquerait l'expulsion de l'eau. La déformation de la couche extérieure qui suivrait pourrait donner lieu à la formation de morphologies originales, d'une façon similaire aux observations de Matsuo et Tanaka (1992).

4.3 Conclusion, perspectives

En conclusion, nous avons établi une nouvelle méthode permettant de fabriquer des vésicules géantes unilamellaires remplies d'un gel d'agarose conférant à la vésicule des propriétés élastiques.

Nous avons mis en évidence l'effet de rétention d'eau du gel sous l'effet d'un choc hyper-osmotique entraînant le dégonflement des vésicules fonctionnalisées. De plus, lors du dégonflement, nous avons constaté l'apparition d'instabilités de formes avec des vésicules qui montrent des facettes, puis des bosses et pics lorsque la concentration initiale de gel est faible (0,07 et 0,18 % w/w). Ces formes rappellent celles d'échinocytes qui sont des formes de globules rouges retrouvées en quantité anormale dans le sang de personnes atteintes de certaines pathologies.

Cette étude ouvre la voie à la fabrication de vésicules géantes contenant une couche mince bi-dimensionnelle d'un gel polymère ancré dans la membrane. Dans ce genre de système élaboré, il serait possible de faire varier sur une gamme la plus large possible tout un ensemble de paramètres physiques tels la courbure spontanée de la membrane (en changeant la composition lipidique de la bicouche ou en changeant les solutions interne et externe à la membrane), les propriétés mécaniques viscoélastiques du gel (en jouant par exemple sur la densité de molécules de réticulation ou le poids moléculaire des chaînes) ou le couplage du réseau polymère à la membrane (en introduisant plus ou moins de molécules d'ancrage à la membrane). L'étude de l'effet de ces variations sur les propriétés macroscopiques de la membrane composite devrait mener à une meilleure compréhension de l'origine des propriétés viscoélastiques du cortex des cellules vivantes et à une meilleure compréhension des morphologies cellulaires observées.

V Résultats, discussion : Système biomimétique de l'adhésion cellulaire

Dans une deuxième partie du premier volet de ma thèse sur des systèmes artificiels, j'ai tenté de mettre en place un système biomimétique de l'adhésion cellulaire. L'idée était de fonctionnaliser des vésicules géantes unilamellaires avec des glycolipides reconnus spécifiquement par des lectines tapissant un substrat de verre.

Nous avons d'abord essayé le couple lactosyl-céramide/PNA (proposé par Anne Imberty et Rachel Auzély du Cermav/CNRS). La lectine PNA (Lotan et al., 1975) reconnaît spécifiquement le groupe lactose du lactosyl-céramide. Le couple GM3/MAL1 (le GM3 est un glycolipide qui a été gentiment fourni par le Dr Yongmin Zhang de l'Institut Curie) a aussi été essayé, la MAL1 étant une autre lectine. L'idée était alors d'utiliser un glycolipide possédant une tête sucre plus importante et ayant donc plus de chance d'être reconnue au milieu des phospholipides de la membrane.

Après la fabrication des vésicules (par électroformation ou par la méthode de formation spontanée), elles ont été testées dans une chambre de cisaillement dont la surface inférieure est constituée d'une lamelle fonctionnalisée par la lectine désirée (lamelles industrielles Xénopore permettant un greffage par liaisons covalentes).

Afin de vérifier cette fonctionnalisation, j'ai utilisé de la PNA marquée à la FITC pour pouvoir visualiser le greffage de la protéine fluorescente. Dans la Figure 5_1, on peut voir que la lectine est répartie sur le substrat de manière non homogène. Ce greffage semble donc insuffisant pour étudier le mouvement de vésicules sur de longues distances.

Toutes les vésicules sous flux étudiées subissent un mouvement de translation et de rotation simultanément, comme cela est observé sur un substrat de verre avec des vésicules non fonctionnalisées (Abkarian et al., 2002). Quand le taux de cisaillement est suffisamment élevé et quelque soit le couple glycolipide/lectine utilisé, on observe leur décollement du substrat du fait de l'existence d'une force de portance (Abkarian et al., 2002). Ces vésicules soumises à un flux de cisaillement rentrent toutes (sauf une) dans le cadre de la théorie de Goldman et al. (1967) qui décrit le mouvement de sphères rigides en écoulement près d'un substrat (Figs 5_2 et 5_3), ce qui montre que ces vésicules n'adhèrent pas au substrat.

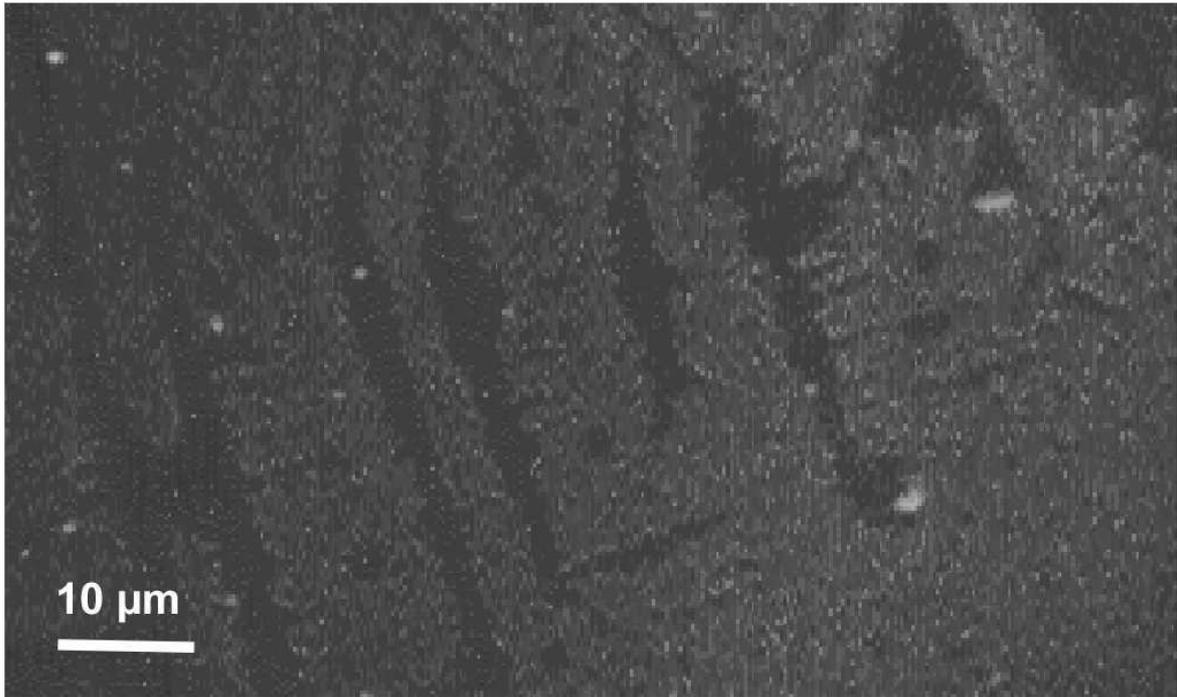


Figure 5_1: Image de fluorescence mettant en évidence la non-uniformité du greffage de PNA-FITC sur une lamelle Xenopore.

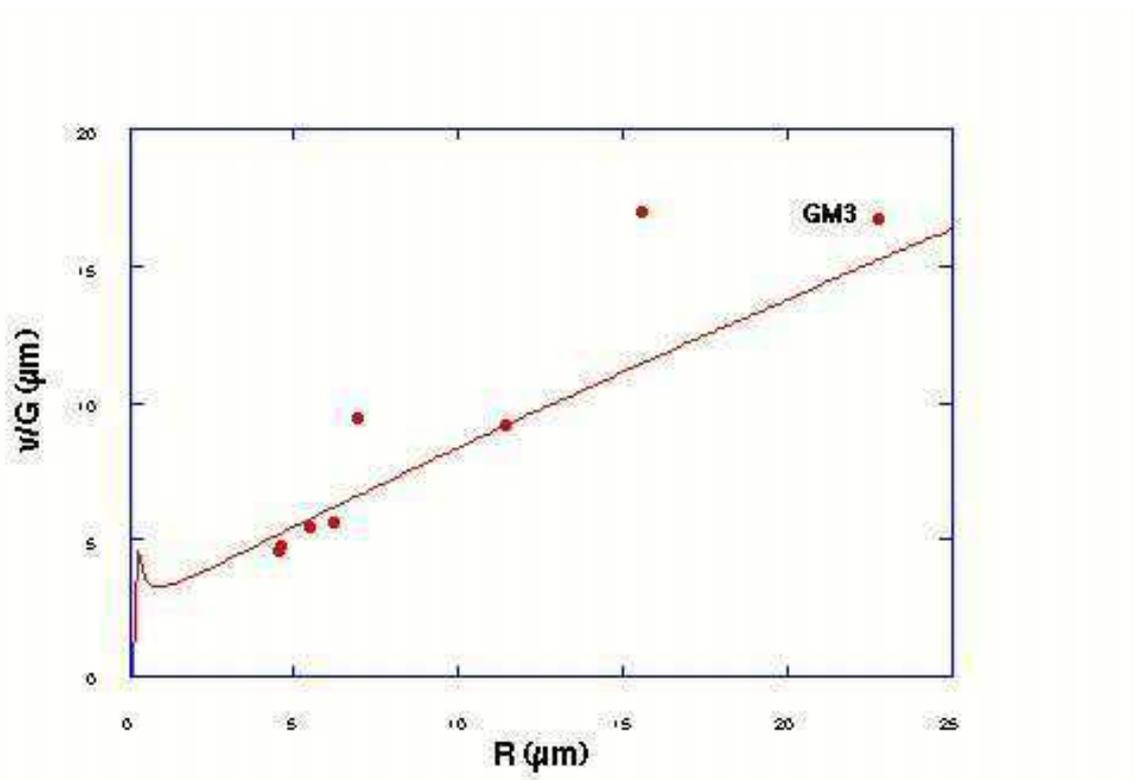


Figure 5_2: Vitesse divisée par le taux de cisaillement en fonction du rayon des vésicules. La courbe rouge est un ajustement par une loi de Goldman et al. (1967).

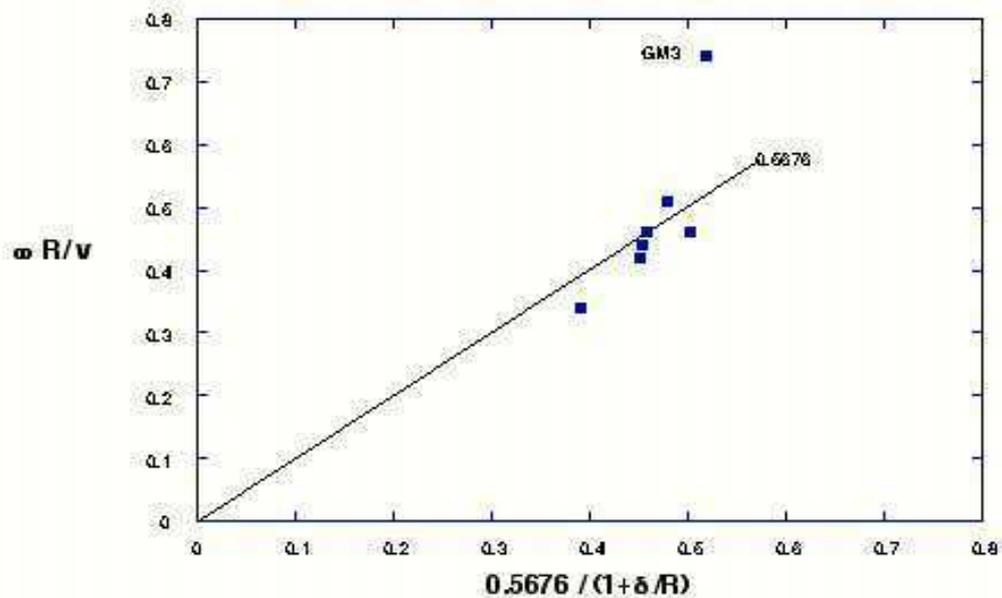


Figure 5_3: Ratio vitesse de rotation sur vitesse de translation en fonction de $0.5676 / (1 + h/R)$ (voir *Introduction*). Goldman et al. (1967) prévoient l'égalité de ces deux termes pour des sphères rigides sous flux. La droite a pour équation $y = x$.

Le mouvement d'une seule vésicule ne peut être décrit par ce modèle théorique, il s'agit d'une vésicule réalisée avec le glycolipide GM3 et mise en contact avec un substrat recouvert de MAL1. Cette vésicule est d'ailleurs caractérisée par un mouvement de rotation plus important ($\omega R/v = 0,74$ comparé à des valeurs entre 0,34 et 0,51 pour les autres vésicules). Cependant, rien n'a permis de mettre en évidence la présence d'une adhérence spécifique entre la vésicule et le substrat recouvert de lectines.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'échec de ces tentatives :

- 1) Les glycolipides n'étaient peut-être pas correctement incorporés dans la bicouche phospholipidique. Des tests de reconnaissance spécifique entre une lectine fluorescente et des vésicules fonctionnalisées doivent être réalisés en utilisant des molécules qui rentrent en compétition avec le lien spécifique testé.
- 2) La tête sucre du lactosyl-céramide ou du GM3 n'était peut-être pas accessible à la lectine. On pourrait ajouter un espaceur chimique entre la tête sucre et les chaînes carbonées comme cela a été fait lors de l'utilisation du glycolipide Lewis^x (Pincet et al., 2001).
- 3) La fonctionnalisation des lamelles Xenopore n'était pas parfaitement homogène. D'autres techniques de greffage doivent être utilisées pour améliorer ce point.

A la suite de mes tentatives, un autre étudiant, actuellement en thèse, Cyrille Vézy, a repris cette étude. Il a travaillé sur le couple biotine-streptavidine et travaille actuellement sur un nouveau couple : lipide à tête Ni-NTA / peptide à 6 histidines.

Introduction au second volet de mon travail de thèse

Application de contraintes sur des systèmes vivants : réorganisation mécanosensible du cytosquelette de cellules *Dictyostelium*

Dans le second volet de mes travaux de recherche, j'ai observé la réponse de cellules vivantes à l'application de contraintes hydrodynamiques de cisaillement. Les cellules utilisées sont les amibes *Dictyostelium discoideum* qui servent d'organisme modèle pour l'étude d'un grand nombre de processus biologiques. Il a été montré que ces cellules sont sensibles aux forces mécaniques et que leur vitesse de migration est accrue par l'application d'un flux caractérisé par une contrainte de cisaillement de l'ordre de 0.5-5 Pa (Décavé et al., 2003 ; Fache et al., 2005).

Les forces mécaniques d'un flux permettant d'orienter ces cellules, mes objectifs étaient de visualiser la réorganisation mécanosensible du cytosquelette de cet organisme à la suite de l'inversion de la direction du flux et de quantifier les cinétiques de relocalisation de protéines d'intérêt du cytosquelette lors de la réorientation cellulaire.

Ainsi, dans la partie VI (*Introduction, état des connaissances : motilité cellulaire et mécanosensibilité*), j'introduis toutes les notions utiles à la bonne compréhension de ce projet de recherches. Je commence de façon générale en rappelant certaines notions sur la motilité cellulaire et en décrivant les réseaux protéiques du cytosquelette. Ces rappels peuvent être utiles à ceux dont le profil est plus physicien que biologiste. Après avoir abordé la motilité de façon générale, je passe en revue certains aspects particuliers de la motilité de différents organismes (*Listeria*, fibroblastes, *Dictyostelium*, ...). Puis, je présente l'amibe *Dictyostelium discoideum* et indique en particulier les avantages pratiques qui en ont fait un organisme modèle reconnu par le National Institute of Health américain. Mon projet de recherches impliquant plusieurs processus biologiques que sont la motilité cellulaire (qui fait appel à l'émission de protrusions, à l'adhésion à un substrat et à la rétraction du bord arrière) et la mécanosensibilité, j'ai décidé de discuter de chacun de ces processus pour permettre au lecteur de situer mon travail dans la vaste étendue des travaux sur ces sujets. J'ai ainsi commencé par décrire les étapes de la migration cellulaire. Je détaille d'abord la première étape lors de la migration cellulaire sur support solide : l'émission de protrusions grâce à la polymérisation de l'actine au front avant. Il m'a semblé important d'insister sur la biochimie de l'actine étant donné que j'ai centré mes observations, entre autres, sur la polymérisation de

l'actine en réponse aux forces mécaniques. En particulier, j'introduis la protéine DdLimE car je l'utiliserai dans mes expériences pour marquer cette protéine majeure du cytosquelette qu'est l'actine. Puis j'aborde la deuxième étape dans la migration qui est l'adhésion des protrusions au support. Nous verrons que les protéines d'adhésion jouent également un rôle important dans la mécanosensibilité. Je passe en particulier en revue les protéines ou structures adhésives recensées chez *Dictyostelium*. Enfin, dans mes expériences, j'ai aussi beaucoup observé la polymérisation en filaments épais de la myosine-II qui participe à la rétraction du bord cellulaire arrière. Il m'a donc semblé intéressant de détailler la dernière étape dans la migration cellulaire qui correspond au détachement du substrat et à la rétraction dépendante de la myosine-II. Ayant tenté de savoir si les microtubules jouent un rôle dans la mécanosensibilité de *Dictyostelium*, je présente brièvement le rôle des microtubules dans la migration cellulaire.

D'autre part, le modèle *Dictyostelium* a beaucoup été utilisé pour découvrir les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la réponse chimiotactique. Dans la partie XI (Résultats : *Réorganisation du cytosquelette et réorientation cellulaire en réponse à un stimulus chimique. Comparaison au cas sous flux*), je compare mes résultats sur la réorganisation du cytosquelette et la réorientation cellulaire que j'ai visualisées et quantifiées soit en réponse à l'inversion d'un gradient de chimioattractants, soit en réponse à l'inversion de la direction du flux hydrodynamique. J'ai donc rappelé les grandes voies de signalisation utilisées dans le chimiotactisme et présentes dans de nombreux organismes, ainsi que les mécanismes de détection d'un gradient chimique.

Mon travail consistant à appliquer des forces mécaniques sur des cellules pour mesurer les effets de ces forces sur ces systèmes complexes actifs, il m'a semblé judicieux de parler de la production de forces par les cellules et de leur transmission au substrat. Par application du principe d'action-réaction, il apparaît logique que ces régions de transmission des forces cellulaires au substrat vont jouer un rôle important dans la perception par les cellules des forces extérieures appliquées. Dans le dernier paragraphe de cette partie VI d'introduction sur le deuxième volet de mon travail de thèse, je développe le sujet de la mécanosensibilité et de la mécanotransduction. La capacité de cellules à détecter et à mesurer des forces mécaniques est primordiale dans de nombreux processus et la perte de cette capacité peut mener à l'apparition de nombreuses pathologies. Je passe en revue les connaissances sur ce sujet dans différents types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, *Dictyostelium*, ...) de manière à présenter les travaux et résultats marquants dans ce domaine et à montrer la diversité des réponses mécanosensibles.

Après cette longue partie d'introduction (que j'ai cherché à rendre accessible aux deux communautés de biologistes et de physiciens), j'enchaîne sur la partie VII (*Matériels et Méthodes*). Dans cette section, je détaille les protocoles utilisés tout au long de ce travail (culture cellulaire et milieu nutritif, souches cellulaires utilisées, conservation des souches, transformations génétiques par électroporation, ...). Je décris le dispositif expérimental d'écoulement et les chambres à flux utilisées avec en particulier la calibration de la chambre à lamelles que j'ai fabriquée spécialement pour ce travail. Enfin, ayant réalisé tous mes films grâce à la microscopie confocale à balayage laser (couplée à la microscopie de contraste de phase), je présente les fondements de cette technique, ainsi que le développement des protéines fluorescentes du type GFP et mRFP qui m'ont été très utiles pour marquer l'actine et la myosine-II. Dans un dernier paragraphe, j'explique les techniques de traitement et d'analyse d'images qui m'ont servi, en insistant sur le programme de détection par contours actifs.

Dans la partie VIII (*Résultats, première partie : Mise en évidence de plusieurs motilités cellulaires sous flux*), je mets en évidence l'existence de plusieurs comportements motiles sous flux selon les conditions de culture cellulaire et l'état de différenciation cellulaire.

Dans la partie IX (*Résultats, deuxième partie : Réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux et cinétiques de relocalisation de protéines*), je présente mes résultats concernant la réponse cellulaire à l'application de forces hydrodynamiques et la réorientation cellulaire à la suite du changement de sens du flux. En particulier, je montre que les forces mécaniques du flux polarisent et orientent les cellules *Dictyostelium* qui émettent des protrusions riches en actine face au flux. Je quantifie, à la suite du changement de sens du flux, les cinétiques de relocalisation des deux protéines actine et myosine-II séparément dans des cellules ne possédant qu'un marqueur mais aussi simultanément dans des cellules doublement marquées pour ces deux protéines. Je décris les étapes permettant la réorientation cellulaire sous flux ainsi que leur succession temporelle.

Dans la partie X (*Résultats, troisième partie : Origine de la mécanosensibilité cellulaire*), je tente de comprendre quelle protéine ou structure cellulaire est impliquée dans la détection et la mesure des forces mécaniques. Précisément, j'étudie le possible rôle de la myosine-II dans la mécanosensibilité à l'aide de mutants myo-II-null. Je montre que le front riche en Lim-GFP contre le flux est très probablement un site d'adhésion au substrat.

Dans la partie XI (*Résultats, quatrième partie : Réorganisation du cytosquelette cellulaire en réponse à un stimulus chimique. Comparaison au cas sous flux*), j'observe et

quantifie la réorganisation du cytosquelette de cellules différenciées lors de l'inversion du gradient chimique (déplacement de l'extrémité de la micropipette libérant les chemoattractants de l'avant à l'arrière d'une cellule en migration). Je compare les cinétiques de relocalisation de protéines obtenues dans ces conditions au cas sous flux.

Enfin, dans la partie XII (*Discussion*), je reprends mes résultats, les analyse et les discute à la lumière de travaux rapportés dans la littérature.

VI Introduction, état des connaissances : motilité cellulaire et mécanosensibilité

6.1 Qu'est-ce que la motilité cellulaire ?

La motilité cellulaire est la capacité d'une cellule de se mouvoir activement. Par opposition au terme de mobilité d'un objet qui indique seulement que cet objet change de position par rapport à un référentiel fixe, le terme de motilité cellulaire implique que la cellule est active dans son mouvement et dépense de l'énergie pour se déplacer.

6.2 Qu'est-ce que le cytosquelette ?

D'un point de vue structurel, toute cellule animale est constituée d'une membrane plasmique, d'un noyau, d'un cytosol (ou cytoplasme) qui contient tout un ensemble d'organites et de structures membranaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, ...) et d'un cytosquelette de filaments protéiques.

Toutes les cellules eucaryotes ont un cytosquelette. C'est un réseau protéique qui joue le rôle de squelette interne et qui s'étend dans tout le cytoplasme. Il donne à la cellule sa forme, sa résistance à des contraintes extérieures, son aptitude à ordonner ses organites et à les transporter d'un endroit à l'autre de la cellule. Le cytosquelette est composé de plusieurs réseaux de filaments protéiques, dont les deux plus importants sont le réseau de filaments d'actine (aussi appelé cytosquelette d'actine) et le réseau de microtubules. Un troisième réseau, celui des filaments intermédiaires est trouvé dans le cytoplasme de la plupart des cellules animales.

Le cytosquelette joue un rôle central dans de nombreux processus biologiques dont la motilité cellulaire. En effet, différents types cellulaires dont un ou plusieurs sous-réseaux du cytosquelette ont été dépolymérisés ne peuvent plus migrer ou moins efficacement (Alberts et al., 1994).

6.3 Description détaillée des réseaux du cytosquelette

Chaque réseau de filaments du cytosquelette est constitué à partir d'un type de monomère(s) protéique(s) différent(s) : l'actine pour les filaments d'actine, la tubuline (α et β)

pour les microtubules et une famille de protéines fibreuses apparentées, comme la vimentine, les lamines ou les kératines, pour les filaments intermédiaires. L'actine et la tubuline ont été particulièrement bien conservées au cours de l'évolution des eucaryotes (Alberts et al., 1994).

6.3.1 Le réseau de filaments d'actine

L'actine est une protéine présente dans toutes les cellules eucaryotes et est souvent la plus abondante des protéines cellulaires. C'est un polypeptide unique de 375 acides aminés. Les filaments d'actine (aussi connus sous le nom de microfilaments ou filaments fins) sont des polymères hélicoïdaux de la protéine actine (Fig. 6_1_A, C). Ils sont polaires, c'est-à-dire qu'ils ont deux extrémités structurellement différentes : une extrémité « moins » à croissance lente et une extrémité « plus » à croissance rapide. A cause de l'apparence orientée en « pointe de flèche » d'un filament d'actine décoré par le moteur moléculaire myosine-II (Schroder et al., 1993 ; Fig. 6_1_D) –la myosine-II est une protéine qui joue un rôle central dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine de cellules musculaires et non musculaires et notamment dans la migration de cellules rampantes (Jay et al., 1993 ; voir la partie « *Troisième et quatrième étapes dans la migration cellulaire : le détachement du substrat et la rétraction* »)–, on parle plus souvent de l'extrémité moins comme de l'extrémité « pointue » (ou pointée) et de l'extrémité plus comme de l'extrémité « barbée » (ou barbelée). Les filaments d'actine apparaissent comme des structures flexibles, d'un diamètre de 5-9 nm et sont reliés par différentes protéines pour former dans les cellules des structures stables ou alternativement des structures labiles hautement dynamiques (variété de faisceaux linéaires, de réseaux bidimensionnels et de gels tridimensionnels). Ils sont surtout concentrés dans le cortex, juste sous la membrane plasmique (Fig. 6_1_A et B).

Dans la partie « *Première étape : l'émission de protrusions au front avant* », nous étudierons plus en détails les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de l'actine en filaments, les protéines qui se lient à l'actine, et la dynamique du cytosquelette d'actine.

6.3.2 Le réseau de microtubules

Les microtubules sont de longs cylindres creux faits de tubuline. Chaque molécule de tubuline est un hétérodimère d' α - et β -tubuline, deux polypeptides globulaires étroitement apparentés et étroitement liés. La structure cylindrique d'un microtubule résulte de l'assemblage en parallèle de 13 protofilaments linéaires, chacun composé de sous-unités d' α -

et β -tubuline en alternance (Fig. 6_1_E). Avec un diamètre externe de 25 nm, ils sont beaucoup plus rigides que les filaments d'actine. Ces 13 protofilaments étant alignés en parallèle avec la même polarité, les microtubules sont eux-mêmes des filaments polaires : une

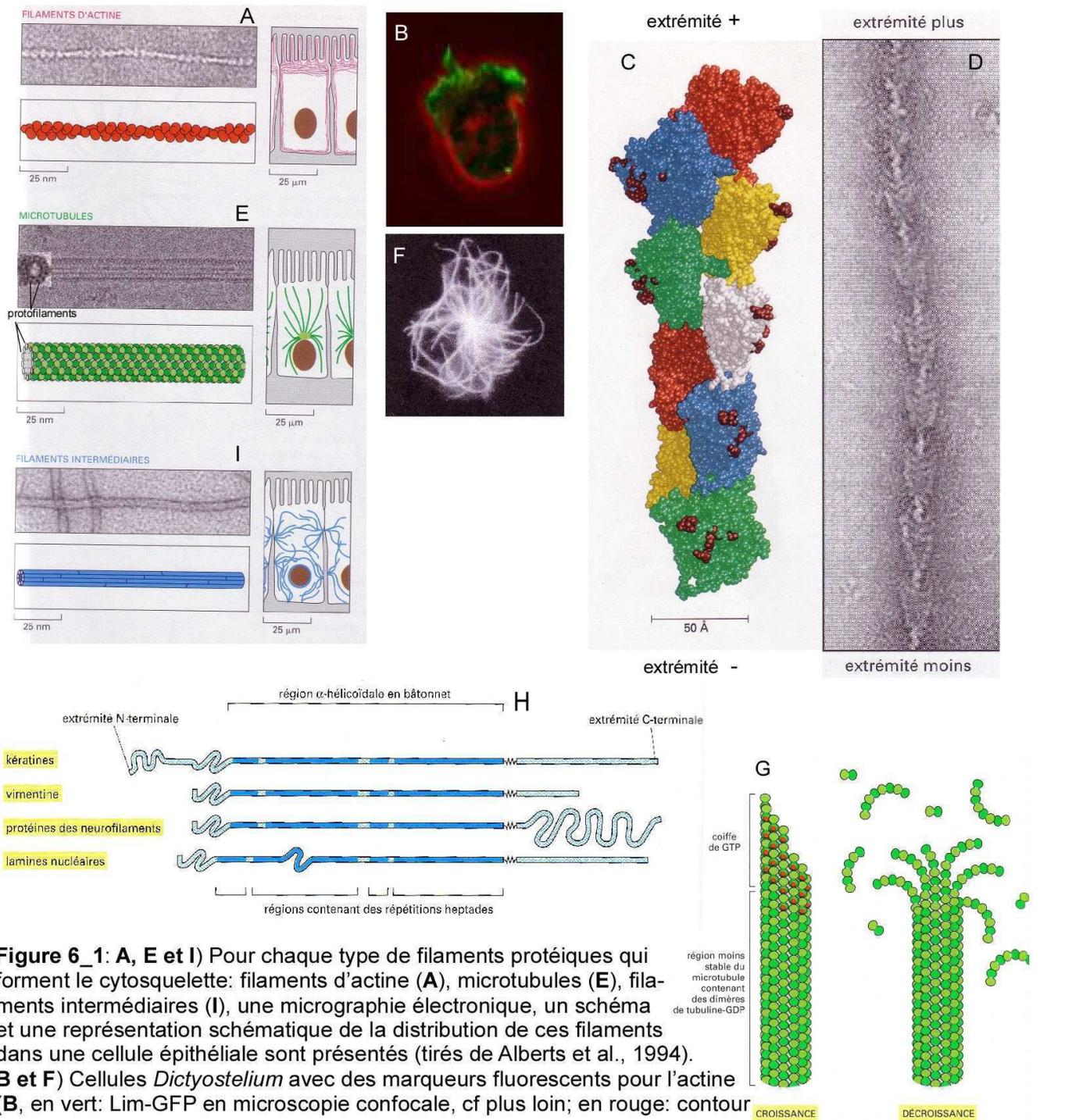


Figure 6_1: A, E et I) Pour chaque type de filaments protéiques qui forment le cytosquelette: filaments d'actine (A), microtubules (E), filaments intermédiaires (I), une micrographie électronique, un schéma et une représentation schématique de la distribution de ces filaments dans une cellule épithéliale sont présentés (tirés de Alberts et al., 1994). **B et F)** Cellules *Dictyostelium* avec des marqueurs fluorescents pour l'actine (B, en vert: Lim-GFP en microscopie confocale, cf plus loin; en rouge: contour cellulaire en contraste de phase), et pour les microtubules (F, GFP- α -tubuline, tiré de Koonce and Khodjakov, 2002). **C)** Structure de l'actine filamenteuse. On peut voir l'interaction d'un monomère avec ses quatre voisins. Tous les monomères pointent dans la même direction. L'hélice se répète après 13 sous-unités. Les sites de liaison à la myosine (rouge foncé) sont à la périphérie du filament (tiré de Stryer, 1995). **D)** Micrographie électronique d'un filament d'actine décoré avec des têtes de myosine-II isolées. Cette décoration met en évidence l'aspect polaire des filaments d'actine. **G)** Croissance et décroissance (instabilité dynamique) de microtubules. L'hydrolyse du GTP après la polymérisation déstabilise les microtubules. **H)** Exemples de protéines fibreuses servant de monomères aux filaments intermédiaires : kératine, vimentine entre autres (D, G et H tirés de Alberts et al., 1994).

extrémité (notée « plus ») est capable de croissance rapide, alors que l'autre extrémité (notée « moins ») a tendance à perdre des sous-unités si elle n'est pas stabilisée. Dans la plupart des cellules, les extrémités moins sont stabilisées par enchâssement dans le centrosome (aussi appelé MicroTubule Organizing Center, MTOC ; centre organisateur des microtubules) de sorte que le réseau de microtubules a un aspect étoilé (Fig. 6_1_F). Les extrémités à croissance rapide sont alors libres pour l'addition de molécules de tubuline. Le centrosome, localisé près du noyau, se trouve proche du centre de la cellule et est le site principal de nucléation des microtubules dans les cellules animales (Alberts et al., 1994). Chacun de ces microtubules est une structure hautement dynamique qui peut aussi bien se raccourcir que s'allonger. Après avoir poussé pendant plusieurs minutes par ajout de sous-unités, l'extrémité plus, qui se trouve alors souvent au bord de la cellule, peut subir une transition brutale qui lui fait perdre des sous-unités, ce qui provoque le rétrécissement rapide du microtubule vers le centrosome si ce n'est sa disparition (on parle d'instabilité dynamique ; Fig. 6_1_G).

Les microtubules gouvernent la localisation des organites membranaires et d'autres composants cellulaires en servant de rails à des moteurs moléculaires comme la kinésine et la dynéine qui se déplacent à des vitesses de l'ordre du $\mu\text{m}/\text{sec}$ en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (voir partie « *La production de forces et leur transmission au substrat* »). Ces filaments rigides jouent aussi un rôle primordial dans la division cellulaire avec, par exemple, la création du fuseau mitotique et la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase.

6.3.3 Le réseau de filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des fibres protéiques résistantes, durables et insolubles, trouvées dans le cytoplasme de la plupart des cellules animales. Leur diamètre apparent (de l'ordre de 8-10 nm) est compris entre celui des filaments d'actine (5-9 nm) et celui des microtubules (25 nm). Ils constituent un réseau étendu qui entoure le noyau et s'étend jusqu'à la périphérie cellulaire, où les filaments interagissent avec la membrane plasmique (Fig. 6_1_I). De plus, un réseau tissé serré de filaments intermédiaires -la lamina nucléaire- double l'enveloppe nucléaire. Les filaments intermédiaires sont particulièrement proéminents dans le cytoplasme des cellules qui sont soumises à des contraintes mécaniques, comme dans les épithéliums, le long des axones et dans tous les types de cellules musculaires. Ils procurent aux cellules animales une résistance aux contraintes mécaniques et particulièrement à l'étirement.

Contrairement à l'actine et à la tubuline, qui sont des protéines globulaires, les nombreux types de monomères protéiques des filaments intermédiaires sont tous des molécules fibreuses très allongées avec une tête amino-terminale, une queue carboxy-terminale et un domaine central en bâtonnet formé d'une région α -hélicoïdale étendue qui permet aux monomères de s'associer en filaments (Fig. 6_1_H). Ces filaments intermédiaires sont non polaires, contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules.

Chez *D. discoideum*, il n'y a pas de filament intermédiaire.

6.4 Différents types de motilités cellulaires (bactérie *Listeria monocytogenes*, fibroblaste, neutrophile, kératocyte, amibe *Dictyostelium*)

Certains types de cellules se déplacent sur une surface bi-dimensionnelle (cellules endothéliales sur la lame basale, cellules en culture sur un substrat de verre ou de plastique, ...), d'autres se déplacent dans un volume tri-dimensionnel (bactéries et spermatozoïdes, fibroblastes dans le tissu conjonctif, kératocytes dans l'épiderme, ...). On peut aussi classer différentes motilités selon qu'elles s'effectuent en milieu liquide (bactéries, spermatozoïdes, ...) ou qu'elles nécessitent un support solide (cellules endothéliales, fibroblastes, kératocytes, amibes ...).

Examinons la motilité des bactéries *Listeria monocytogenes* dans un fluide.

6.4.1 Motilité de bactéries comme *Listeria monocytogenes*

Les bactéries sont les plus simples des organismes trouvés dans la plupart des environnements naturels. Ce sont des cellules sphériques ou en forme de bâtonnets, d'une dimension linéaire courante de quelques micromètres (Fig. 6_2 A). Elles possèdent souvent une coque protectrice résistante, sous laquelle une membrane plasmique entoure un compartiment cytoplasmique unique contenant de l'ADN, de l'ARN, des protéines et de petites molécules (Alberts et al., 1994).

Les bactéries motiles se déplacent vers de fortes concentrations de nutriments (substances attractives), tels les glucides, les acides aminés et les petits peptides et loin de fortes concentrations de divers produits chimiques toxiques (substances répulsives).

Listeria monocytogenes est une bactérie qui provoque une forme sévère d'empoisonnement alimentaire. Cette bactérie pathogène entre dans les cellules en étant

phagocytée (Fig. 6_2_B). Elle s'échappe ensuite dans le cytosol de la cellule hôte en sécrétant des enzymes qui détruisent la membrane du phagosome. Une fois dans le cytosol, les bactéries se divisent et se répandent aux cellules voisines. En effet, elles se déplacent en utilisant les protéines de la cellule hôte et en canalisant la polymérisation de l'actine dans une région de sa surface. Elle peut alors atteindre des vitesses de l'ordre de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Tilney and Portnoy, 1989; Theriot et al., 1992). Quand elle bute contre la membrane plasmique de la cellule hôte, elle provoque la déformation de la membrane plasmique et la formation d'une longue extension ayant pour extrémité le corps de la bactérie. Cette extension peut à nouveau être phagocytée par une cellule voisine qui sera à son tour infectée. *Listeria monocytogenes* passe donc du cytoplasme d'une cellule au cytoplasme d'une cellule voisine sans s'exposer à l'environnement extracellulaire et évite ainsi d'être reconnue par des anticorps produits par l'organisme infecté.

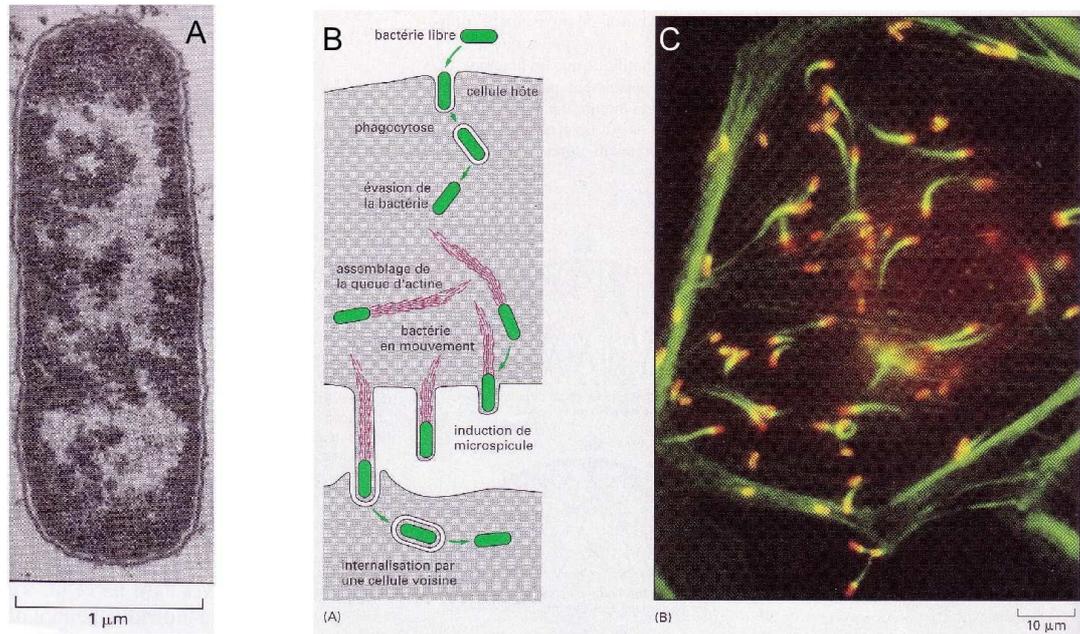
Lorsqu'elle se déplace, la bactérie laisse une comète de filaments d'actine derrière elle que l'on peut marquer avec une sonde fluorescente (Fig. 6_2_C). Ces filaments d'actine dans la queue sont stationnaires : ils se forment à l'arrière de la bactérie et n'ont aucun mouvement, ce qui donne une trace fixe au fur et à mesure de l'avancée de la bactérie, comme la trace blanche d'un avion dans le ciel. L'extrémité arrière de la trace met environ une minute pour disparaître, disparition due à sa dépolymérisation grâce à des facteurs dépolymérisants présents dans le cytosol de la cellule hôte. Cette disparition équivaut à la dispersion des gouttes d'eau dans la traînée blanche d'un avion. L'assemblage des filaments d'actine derrière la bactérie est induit par une protéine spécifique à sa surface, ActA (Kocks et al., 1993; Welch et al., 1998).

Au contraire des bactéries qui se déplacent dans un liquide, il est tout un ensemble de cellules qui ne peuvent pas se déplacer en milieu liquide et ont besoin d'un support solide pour exercer des forces sur ce dernier et ainsi générer leur mouvement. Ces cellules sont des cellules dites rampantes (crawling cells). Parmi ces cellules, on trouve, entre autres, les fibroblastes, les leucocytes, les kératocytes et les amibes.

6.4.2 Motilité de fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules présentes dans les tissus conjonctifs (Fig. 6_3_A). Elles sécrètent des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène. Les cellules du tissu conjonctif jouent un rôle essentiel dans le soutien et la réparation de la majorité des

tissus et des organes. Les fibroblastes sont faciles à cultiver in vitro, ce qui a favorisé leur utilisation pour des études de biologie cellulaire.



Figure_6_2: A) Micrographie électronique d'une bactérie *E. coli*. B) La bactérie *Listeria Monocytogenes* se répand de cellule en cellule, sans passer dans le milieu extracellulaire, en induisant l'assemblage de filaments d'actine dans le cytosol de la cellule hôte. C) Marquages fluorescents des bactéries dans une cellule hôte. Les bactéries (rouges) sont suivies d'une comète d'actine (jaune puis verte) (tirés de Alberts et al., 1994).

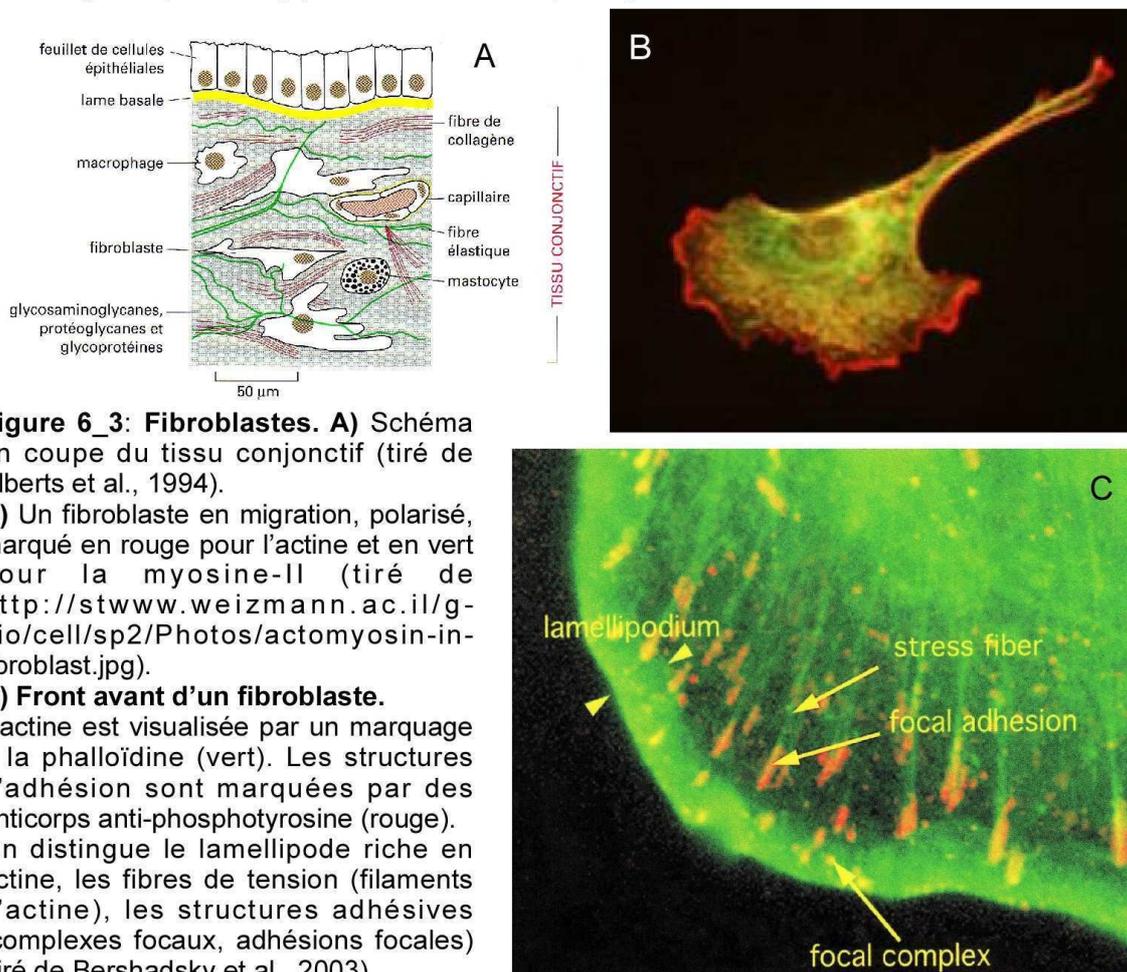


Figure 6_3: Fibroblastes. A) Schéma en coupe du tissu conjonctif (tiré de Alberts et al., 1994).

B) Un fibroblaste en migration, polarisé, marqué en rouge pour l'actine et en vert pour la myosine-II (tiré de <http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/cell/sp2/Photos/actomyosin-in-fibroblast.jpg>).

C) Front avant d'un fibroblaste. L'actine est visualisée par un marquage à la phalloïdine (vert). Les structures d'adhésion sont marquées par des anticorps anti-phosphotyrosine (rouge). On distingue le lamellipode riche en actine, les fibres de tension (filaments d'actine), les structures adhésives (complexes focaux, adhésions focales) (tiré de Bershadsky et al., 2003).

Les fibroblastes sont des cellules qui, lorsqu'elles sont polarisées, migrent relativement lentement à des vitesses légèrement inférieures au $\mu\text{m}/\text{min}$ sur un substrat par exemple recouvert de collagène (Fig. 6_3_B). Elles possèdent des microtubules, des filaments intermédiaires et des filaments d'actine. Les filaments d'actine, qui sont présents dans toute la cellule, convergent au niveau des zones d'adhésion au substrat (appelées contacts focaux ou adhésions focales) sous la forme de fibres de tension (Burrige et al., 1988 ; Fig. 6_3_C). Ces filaments d'actine sont indispensables pour exercer les forces nécessaires à la motilité sur un substrat (Pelham and Wang, 1999). Les microtubules ne sont pas indispensables à la motilité et à la polarisation de fibroblastes de cultures primaires, mais la disruption des microtubules réduit significativement la polarisation de cellules de cultures secondaires ou plus. Les cellules sont aussi de plus en plus sensibles aux drogues éliminant les microtubules qu'elles sont cultivées longtemps en culture primaire (Middleton et al., 1989). La polarisation des fibroblastes devient donc dépendante du réseau de microtubules dans les 48 heures suivant leur isolation des tissus parents.

6.4.3 Motilité de neutrophiles

Le mouvement chimiotactique de certains globules blancs (les neutrophiles) vers la source d'une infection bactérienne a beaucoup été étudié. Les neutrophiles ont des récepteurs à leur surface qui les rend capables de détecter de faibles concentrations de peptides N-formylés dérivés des protéines bactériennes (en effet, seuls les procaryotes commencent la synthèse protéique avec de la N-formylméthionine). Une différence de seulement 1 % dans la concentration de ces peptides d'un côté à l'autre du neutrophile peut le guider vers ses cibles permettant leur phagocytose et leur destruction (Devreotes and Zigmond, 1988).

Les neutrophiles sont habituellement ronds (lorsqu'ils circulent dans les vaisseaux sanguins) mais ils acquièrent rapidement une polarité en réponse à une stimulation chimiotactique, avec un lamellipode au front avant et un uropode à l'arrière. Dans ces conditions, ces cellules migrent à des vitesses d'environ 5-10 $\mu\text{m}/\text{min}$. Elles possèdent des filaments d'actine majoritairement présents dans le lamellipode avant (Fig. 6_4_A) et qui sont indispensables à la migration, des microtubules et un réseau de filaments intermédiaires. Les filaments d'actine et la myosine-II (nous reparlerons de cette protéine en détails plus tard) sont nécessaires au développement et à la maintenance d'une asymétrie du réseau de microtubules qui sont exclus du lamellipode lorsque les cellules sont polarisées (Fig. 6_4_B ;

Eddy et al., 2002). Ce processus permettrait de renforcer la polarité cellulaire lors de la migration des neutrophiles.

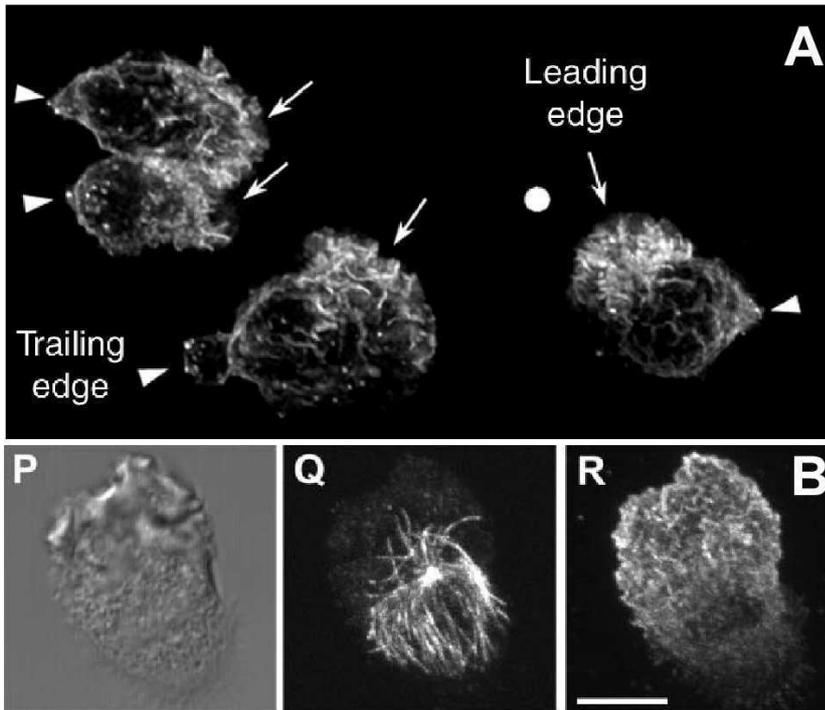


Figure 6_4: Neutrophiles

A) Neutrophiles humains attirés par une source (rond blanc) de chimioattractants (fMLP).

L'actine filamenteuse s'accumule au front avant. Les cellules montrent des formes polarisées avec un bord arrière (pointeurs) et un front avant (flèches) dirigé vers la source de chimioattractants (tiré de Rickert et al., 2000).

B) Les microtubules se réorientent vers l'uropode, après que la cellule se soit polarisée dans un gradient de fMLP sur une surface recouverte de fibronectine.

P) Image DIC, Q) Microtubules, R) Actine (tiré de Eddy et al., 2002).

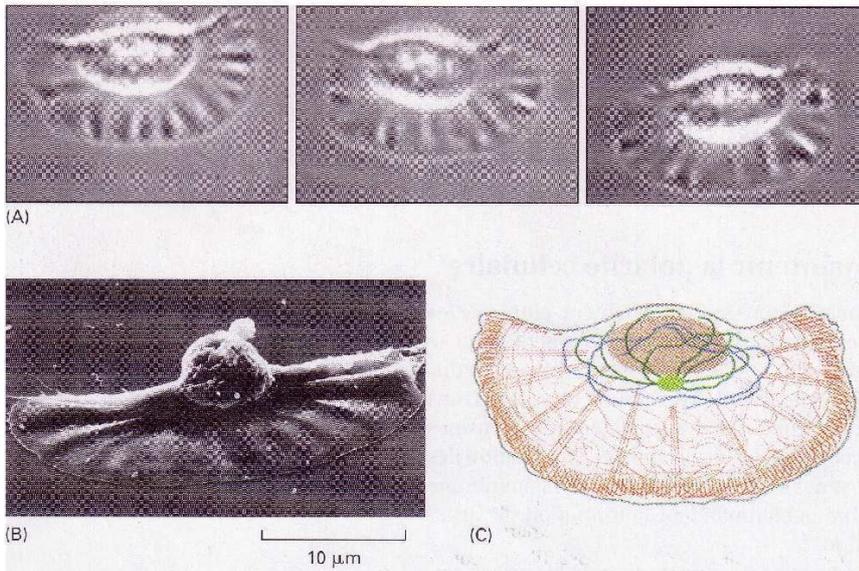


Figure 6_5: Kératocytes

A) Photos prises à 15 sec d'intervalle. La cellule migre à environ 15 $\mu\text{m}/\text{min}$.

B) Image MEB (microscopie électronique à balayage) d'un kératocyte. Le bord avant est très plat. Le corps de la cellule contenant le noyau traîne à l'arrière.

C) Distribution schématique des filaments du cytosquelette dans un kératocyte. Les filaments d'actine (rouge) remplissent la marge avant aplatie. Les microtubules (vert) et les filaments intermédiaires (bleu) sont restreints à la région proche du noyau (tiré de Alberts et al., 1994).

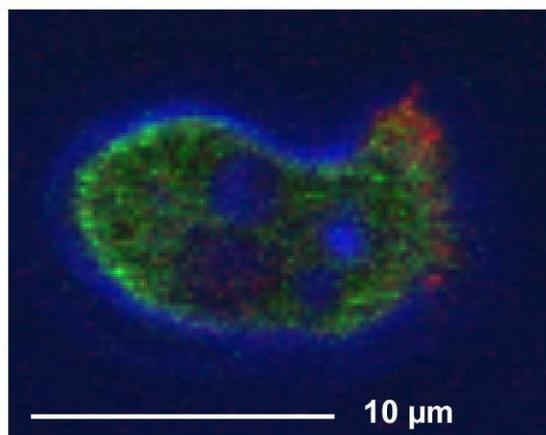


Figure 6_6: *Dictyostelium discoideum*

Une cellule *Dictyostelium* en migration est marquée avec des protéines de fusion. La mRFP-Lim (rouge, voir la partie "Protéines qui interagissent avec l'actine") marque l'actine, et s'accumule au front avant. La GFP-myosine-II (verte) marque le bord arrière de cette cellule polarisée.

6.4.4 Motilité de kératocytes

Les kératocytes (ou kératinocytes) sont les cellules qui composent majoritairement l'épithélium pluristratifié qu'est l'épiderme. Elles sont appelées ainsi car leur activité est la synthèse de kératine, qui sous certaines formes, dites « dures », sont spécifiques des cheveux et des ongles.

Un modèle cellulaire très utilisé pour l'étude de la migration cellulaire est le kératocyte de l'épiderme de poisson (fish epidermal keratocyte), qui est donc isolé à partir d'écaillés de poisson (Fig. 6_5_A). Ces cellules migrent de façon rapide en culture, se déplaçant à des vitesses de 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ ou plus. Elles disposent des trois types de structures filamenteuses : filaments intermédiaires, microtubules et filaments d'actine. Un immunomarquage avec des anticorps indique que les filaments intermédiaires et les microtubules sont présents seulement dans la région de traîne autour du noyau, alors que le bord avant aplati de la cellule est riche en filaments d'actine (Fig. 6_5_B et C ; Lee et al., 1993). De plus, des cellules traitées avec une substance qui dépolymérise les microtubules migrent tout aussi rapidement que des cellules non traitées (Euteneuer and Schliwa, 1984), tandis que la migration est arrêtée immédiatement par des agents qui interfèrent avec les filaments d'actine. Les filaments d'actine semblent donc capables de faire bouger un kératocyte sur une surface et aussi de maintenir la forme distinctive et la polarité de cette cellule.

6.4.5 Motilité de *Dictyostelium discoideum*

Dans la nature, l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Fig. 6_6) vit dans les couches superficielles constituées de feuilles en décomposition du sol de forêts tempérées. Elle se nourrit en phagocytant (ingestion semblable à l'endocytose de particules solides) des microorganismes (levures, bactéries) qu'elle détecte grâce aux molécules chimiques émises par ces derniers (détection grâce au chimiotactisme).

Dictyostelium se déplace en atteignant des vitesses de l'ordre de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$. Elle possède un réseau de filaments d'actine, un réseau de microtubules, mais pas de filaments intermédiaires. Les filaments d'actine, qui sont concentrés au front avant émettant des protrusions, sont essentiels à sa motilité. En effet, l'utilisation de drogues comme la latrunculine-A, qui dépolymérise le réseau d'actine, rend les cellules rondes et les empêche de migrer. Par contre, ces cellules peuvent conserver leur polarité et migrer sans microtubules

(de Priester et al., 1988), bien que les microtubules jouent un rôle dans la stabilisation des pseudopodes émis (Ueda et al., 1997).

Tous les travaux effectués sur cellules vivantes lors de cette thèse ont été réalisés avec l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Pourquoi avoir choisi de travailler avec cet organisme, quels sont ses avantages ?

6.5 L'amibe *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum est un eucaryote (c'est-à-dire qu'il possède un noyau, noyau qui contient la plus grande partie de l'ADN cellulaire) haploïde (la cellule ne contient qu'un seul jeu de chromosomes, c'est-à-dire qu'une seule copie de chaque gène). Comme nous l'avons vu plus haut, c'est un phagocytaire professionnel, comme les macrophages ou les neutrophiles. Dans des conditions d'apport nutritif, l'amibe vit sous forme unicellulaire et se divise régulièrement selon un cycle de quelques heures. On dit que les cellules sont dans leur stade végétatif. Quand cet apport nutritif vient à manquer, *D. discoideum* cesse de se diviser et environ 10^5 cellules se réunissent pour former un agrégat multicellulaire grâce à une signalisation inter- et intra-cellulaire qui fait intervenir l'AMP cyclique (Gerisch, 1982; pour une revue, voir Coates and Harwood, 2001). Les cellules sont alors dites agrégation-compétentes et elles engagent un cycle de développement. L'agrégat ainsi formé subit toute une série d'étapes de morphogenèse (monticule (mound), limaçon (slug), culmination, corps fructifère (fruiting body); Ashworth, 1971; Fig. 6_7). Après avoir atteint le stade de monticule, les cellules commencent à se différencier en cellules pré-spores et cellules pré-tige. Lorsque le limaçon est formé, celui-ci se déplace comme une seule masse à la recherche de bonnes conditions pour continuer son développement. Si la nourriture continue à manquer, un cycle de différenciation irréversible est engagé. Le limaçon culmine et finalement donne naissance à un corps fructifère constitué d'une tige (cellules tige mortes) qui supporte une masse de spores. Ces spores qui sont très résistantes restent à l'état de spores tant que la nourriture manque. Au contraire, quand la nourriture redevient abondante, les spores germent et donnent à nouveau des amibes unicellulaires (Ashworth, 1971).

D'un point de vue évolution, la phylogénie reposant sur l'analyse du protéome montre que *Dictyostelium* a divergé de la branche des animaux-champignons après la séparation des deux branches végétaux / animaux (Fig. 6_8 ; Eichinger et al., 2005).

Dictyostelium a prouvé être un bon organisme pour étudier de nombreux processus biologiques tels la migration cellulaire, le chimiotactisme, la phagocytose, la division cellulaire, la morphogenèse, la différenciation cellulaire ou la transduction du signal.

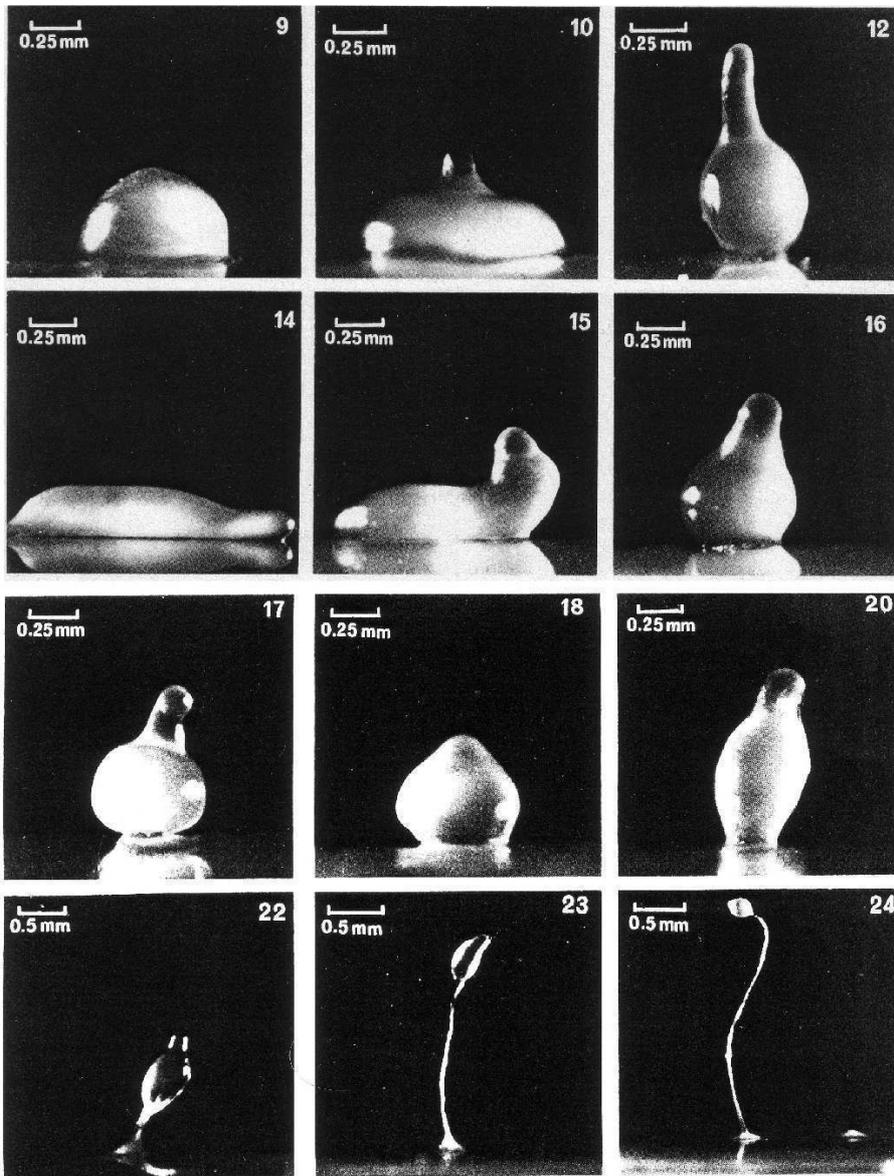


Figure 6_7: Le cycle de développement de *Dictyostelium discoideum*. Séquences des changements morphologiques observés avec un agrégat multicellulaire durant le développement normal de cellules *Dictyostelium* NC4 à 22°C sur agar. Les nombres indiquent le temps approximatif, en heures, après l'initiation du développement (tiré de Loomis, 1982).

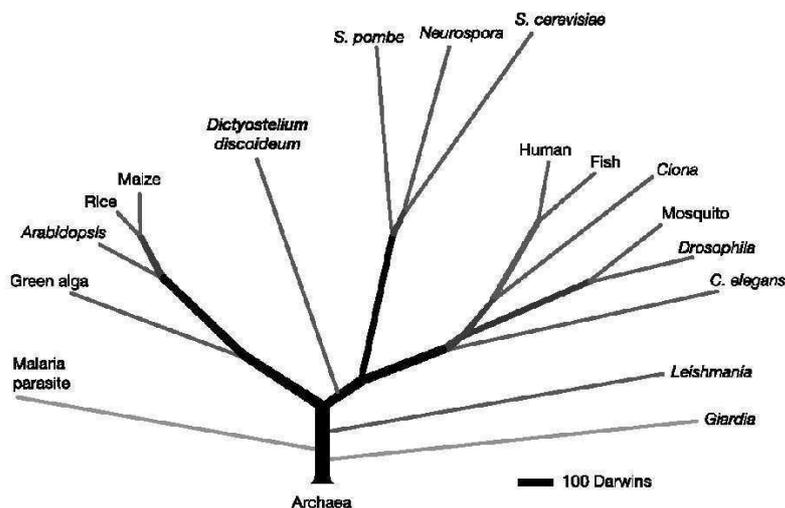


Figure 6_8: Arbre phylogénétique créé par analyse protéomique (tiré de Eichinger et al., 2005).

Durant le stade végétatif, l'adhésion cellule-substrat, la motilité unicellulaire sur un substrat, la phagocytose et la division cellulaire peuvent être observées et quantifiées. C'est durant le cycle de développement que l'adhésion cellule-cellule, la morphogenèse et la différenciation cellulaire (en cellules tige ou cellules spores) interviennent et peuvent être étudiées.

Cet organisme présente de nombreux avantages :

- C'est un organisme non pathogène donc sans danger pour l'expérimentateur.
- *D. discoideum* peut être cultivé en laboratoire sur milieu solide recouvert de bactéries ou dans un milieu nutritif liquide. En effet, Watts et Ashworth ont développé un milieu liquide simplifié et ont isolé une souche mutante (AX2) qui est capable de grandir dans ce milieu en se nourrissant par pinocytose (endocytose de phase fluide) (Watts and Ashworth, 1970). Les cultures en milieu liquide sont appelées axéniques (sans bactérie) et peuvent être agitées.
- Des populations homogènes d'amibes peuvent être cultivées en grande quantité au laboratoire, ce qui permet par exemple de récupérer de grandes quantités de protéines purifiées.
- Le génome de *Dictyostelium* est totalement séquencé (Eichinger et al., 2005).
- *Dictyostelium* est haploïde, ce qui facilite les manipulations génétiques (par recombinaison homologue, ARN antisens,...) (Nellen et al., 1984; Howard et al., 1988; Ruppel et al., 1994; Eichinger et al., 1999; Gerisch and Müller-Taubenberger, 2003). C'est une cellule appropriée dans les approches de mutagenèse aléatoire de large échelle puisqu'elle permet d'évaluer l'état fonctionnel in vivo des protéines mutées. Elle est particulièrement adaptée à l'analyse génétique et à l'observation de l'effet de mutations qui résultent en la suppression, la surexpression ou la modification de protéines spécifiques. Ainsi cet organisme rend possible d'effectuer des tests in vivo et in vitro de fonctionnalité de protéines mutées (Ruppel et al., 1994).
- Les comparaisons de séquences protéiques avec celles d'autres organismes placent *D. discoideum* plus près des mammifères ou des plantes que des levures. Cet organisme est donc évolué et possède de nombreuses fonctions cellulaires élaborées tout en restant simple à manipuler. Par exemple, le cytosquelette d'actine de *Dictyostelium* contient toutes les classes de protéines qui se lient à l'actine (Actin-Binding Proteins, ABPs) qui ont été trouvées dans les cellules eucaryotes (Eichinger et al., 1999).
- Une différence fondamentale avec les animaux est que ces derniers se développent à partir d'une cellule qui subit de nombreux cycles de division et de différenciation. Au contraire, quand *Dictyostelium* entre dans son cycle de développement, il n'y a plus de

cycle de division cellulaire et la multicellularité est atteinte en assemblant un grand nombre de cellules unicellulaires. Cela simplifie grandement l'étude du développement et fournit un moyen facile d'étudier l'adhésion cellule-cellule chez cette amibe (Coates and Harwood, 2001).

- La possibilité d'étudier différentes formes de migration cellulaire selon le stade dans lequel se trouve l'amibe. Dans le stade végétatif, les cellules non soumises à un stimulus sont douées d'une motilité exploratoire (Fukui et al., 1991). Elles peuvent aussi migrer par chimiotactisme à l'acide folique sécrété par exemple par des bactéries (Yumura, 1994). Lorsque les cellules sont agrégation-compétentes, elles migrent par chimiotactisme à l'AMPc, molécule sécrétée par leurs congénères. On parle de motilité chimiotactique (Parent and Devreotes, 1999). Lorsque dans leur cycle de développement, l'agrégat cellulaire a atteint le stade de limaçon, on peut alors étudier la motilité collective qui se traduit par le mouvement global d'une structure multicellulaire (Rieu et al., 2005). Dans le stade unicellulaire, les cellules *Dictyostelium* ont une forme et une manière de se mouvoir qui ressemblent de près à celles des cellules des organismes supérieurs.

Dictyostelium discoideum a été reconnu comme organisme modèle par le National Institute of Health américain (nih.gov).

Dans la suite de cet état des connaissances, les résultats exposés ne se limiteront pas forcément à *Dictyostelium*.

6.6 La migration cellulaire sur support solide

La migration cellulaire est le processus biologique grâce auquel une cellule se déplace activement en dépensant de l'énergie. Concernant la migration cellulaire sur un support solide, on peut la décomposer en quatre étapes successives et ce quelles que soient les causes provoquant cette migration (telles que l'attraction par une molécule chimique dans le cas du chimiotactisme, la stimulation par un stress hydrodynamique, ...) :

- l'émission de protrusions au front avant (pseudopodes, filopodes, lamellipodes, blebs, ...)
- l'adhérence (ou adhésion) de ces protrusions sur le support sur lequel se meut la cellule

- le détachement de l'arrière de la cellule du support
- la rétraction de l'arrière

Les deux dernières étapes peuvent être regroupées en une seule : la traction, qui correspond au déplacement global vers l'avant du corps de la cellule.

6.6.1 Première étape : l'émission de protrusions au front avant

L'un des modèles les plus répandus et les mieux acceptés est que le front avant d'une cellule avance par polymérisation de l'actine qui pousse la membrane (Mitchison and Cramer, 1996 ; Carlier, 1998 ; Carlier et al., 2003 ; Marcy et al., 2004 ; Giganti et al., 2005).

L'actine apparaissant donc comme l'une des protéines jouant un rôle central lors de l'émission de protrusions, intéressons-nous de manière plus détaillée à l'assemblage de cette protéine en filaments.

6.6.1.1 L'actine

L'actine est présente dans tous les eucaryotes et est souvent la protéine la plus abondante des cellules (5 % ou plus des protéines de la cellule). C'est l'une des protéines les mieux conservées durant l'évolution. Elle se trouve sous 4 formes : G-actine (pour globulaire), F-actine (pour filamenteuse), chacune liée à une molécule d'ATP (adénosine 5'-triphosphate) ou d'ADP (adénosine 5'-diphosphate). Elle a été isolée pour la première fois à partir de cellules musculaires par Straub en 1942 (Szent-Gyorgyi, 1945). Le monomère d'actine libre (G-actine) est une protéine globulaire de 42 kDa, composée d'une unique chaîne polypeptidique de 375 acides aminés (Kabsch et al., 1990).

6.6.1.2 La polymérisation de l'actine en filament

Chaque monomère d'actine possède à sa surface des sites de liaison à d'autres monomères d'actine pour former un polymère qui aura la forme d'un long filament de plusieurs micromètres. Le mécanisme de polymérisation se divise en deux étapes : d'abord une étape lente (phase de latence, de nucléation) qui aboutit à la formation d'un trimère d'actine, puis une étape plus rapide (phase de croissance) qui correspond à l'addition successive de monomères d'actine aux extrémités barbée et pointée (Bray, 1992). Une fois la

polymérisation enclenchée, le processus peut être décrit comme l'association réversible de monomères d'actine sur un filament. Le nombre de monomères qui sont ajoutés au polymère par seconde est proportionnel à la concentration de sous-unités libres, mais les sous-unités quittent le polymère à un taux constant indépendant de cette concentration. On peut donc écrire le taux de croissance (exprimé en s^{-1}) de la façon suivante :

$$V = k_{on} \times [G\text{-actine}] - k_{off}$$

où la vitesse d'addition de monomères est donnée par la constante k_{on} (exprimée en $\mu M^{-1}s^{-1}$) et la vitesse de la perte de monomères est donnée par k_{off} (exprimée en s^{-1}). A la **concentration critique** C_c , définie par :

$$C_c = k_{off}/k_{on} = 1/K,$$

la polymérisation est en équilibre avec la dépolymérisation. K est la constante d'équilibre pour l'addition de sous-unités (Figs 6_9 et 6_10).

Lorsque la concentration d'actine libre est au-dessus de sa concentration critique, la G-actine monomérique polymérise spontanément pour allonger un filament. Les concentrations critiques pour la polymérisation de l'actine (c'est-à-dire de la G-actine-ATP et de la G-actine-ADP à l'extrémité pointée ou à l'extrémité barbée) sont toutes de l'ordre de 0.1 à 1 μM . Or la concentration de G-actine mesurée dans une variété de types cellulaires s'élève à environ 10-200 μM (environ 0.5 - 8 mg/mL). Chez *D. discoideum*, il a été rapporté une concentration totale d'actine de 100 μM (Podolski and Steck, 1990). Les concentrations de G-actine dans les cellules sont donc bien supérieures aux concentrations critiques. Ceci est possible parce que la cellule a mis au point des mécanismes pour empêcher une grande partie de son actine monomérique de s'assembler dans des filaments, afin de conserver un pool important de G-actine permettant une grande réactivité cellulaire, comme nous le verrons plus loin. Environ 50 % de l'actine est polymérisée sous forme de filaments (Schafer and Cooper, 1995).

6.6.1.3 Les filaments d'actine sont polaires

Comme nous l'avons vu dans la partie « Réseau de filaments d'actine », les filaments d'actine sont orientés, avec une extrémité pointée (pointed end) et une extrémité barbée (barbed end) (Schroder et al., 1993). D'après les constantes d'association et de dissociation mentionnées sur la figure (Fig. 6_9) pour les différentes formes d'actine à chaque extrémité d'un filament, il apparaît que la polymérisation privilégiée est celle de la G-actine-ATP à

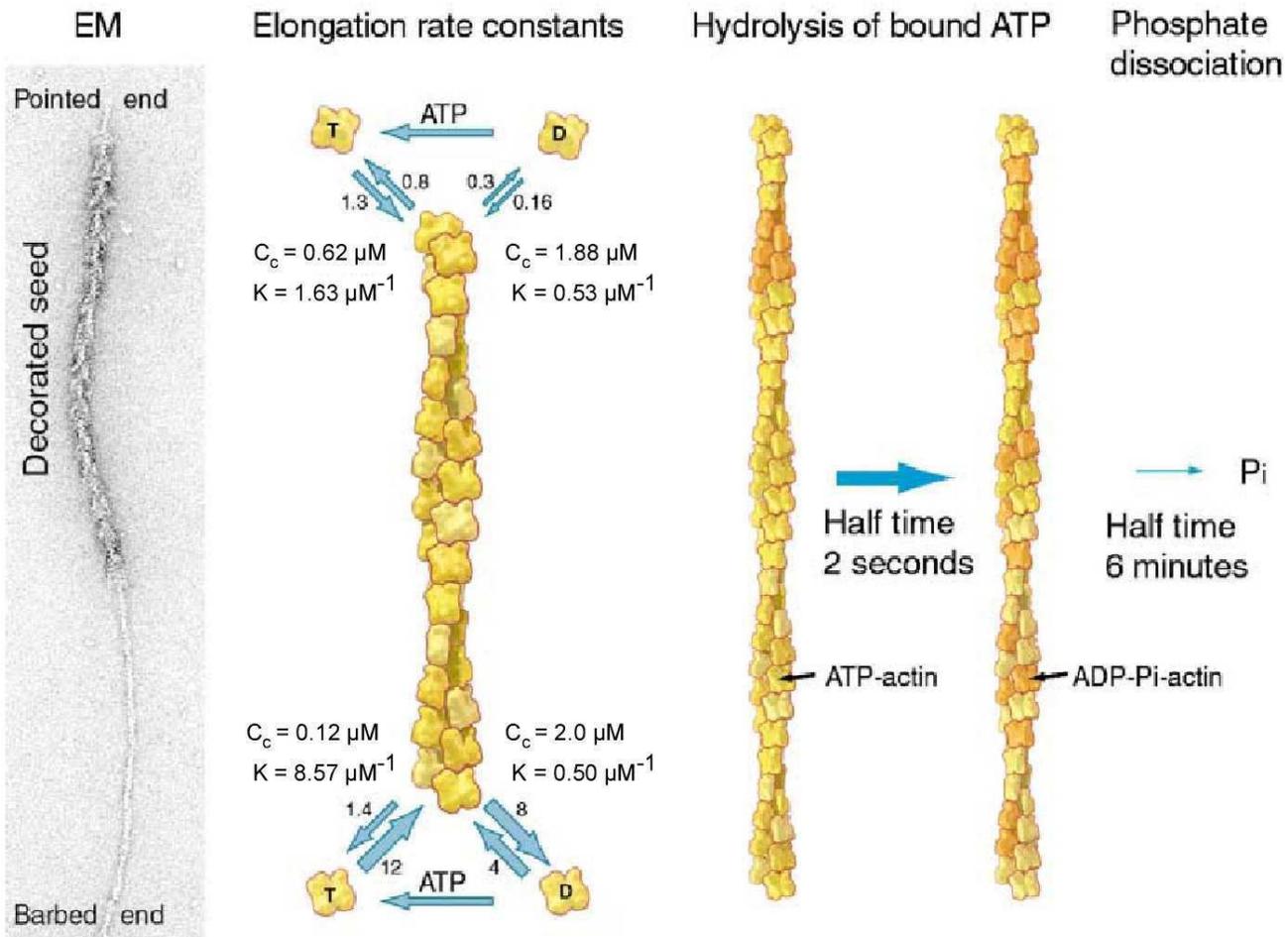


Figure 6_9: Polymérisation de l'actine: élongation d'un filament d'actine, hydrolyse de l'ATP, dissociation du phosphate. Les constantes d'association ont pour unité le $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Les constantes de dissociation ont pour unité la s^{-1} . Le ratio de la constante de dissociation sur la constante d'association donne la concentration critique C_c . L'inverse donne la constante d'équilibre d'association, K . Les constantes d'équilibre pour l'actine-ATP (respectivement pour l'actine-ADP) diffèrent aux deux extrémités du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP d'une sous-unité d'actine-ATP est rapide, mais la dissociation du phosphate est lente (adapté de Pollard and Borisy, 2003).

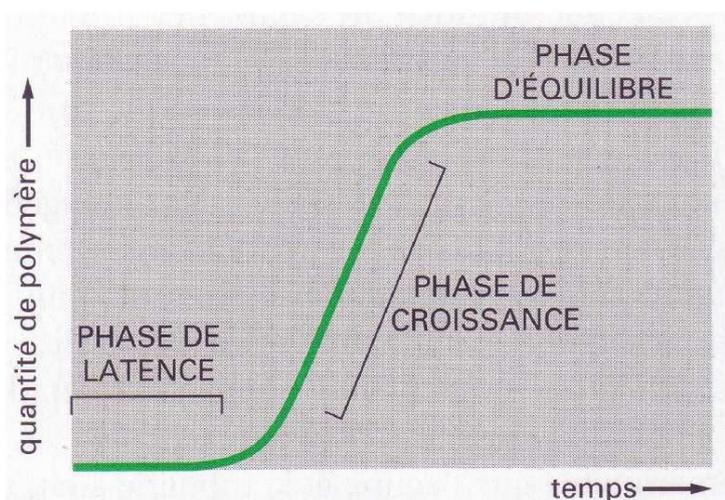


Figure 6_10: Lorsque des filaments croissent à partir d'un pool de sous-unités d'actine globulaires, la première étape de nucléation est très lente (phase de latence). Puis, lorsque des trimères apparaissent, la croissance se fait plus rapidement à chaque extrémité du trimère (phase de croissance). Enfin, les filaments sont en permanence raccourcis et allongés : on a atteint la phase d'équilibre (tiré d'Alberts et al., 1994).

l'extrémité barbée. On a donc une extrémité barbée caractérisée par une polymérisation plus rapide que celle de l'extrémité pointée (jusqu'à 10 fois plus rapide).

6.6.1.4 Hydrolyse de l'ATP et mouvement de tapis roulant (treadmilling)

D'autre part, l'actine incorporée dans le filament hydrolyse en quelques secondes l'ATP en ADP (Fig. 6_9). L'hydrolyse du nucléotide lié réduit l'affinité de liaison de la sous-unité d'actine pour les sous-unités voisines, et rend donc plus facile sa dissociation du filament. La dissociation du phosphate de la sous-unité est plus lente et nécessite quelques minutes. Nous verrons plus tard en parlant de l'ADF/cofiline et de la profiline que la croissance des filaments d'actine sera finalement orientée dans une seule direction privilégiée : le filament croît en polymérisant à l'extrémité barbée et décroît en se dépolymérisant à l'extrémité pointée. On a donc un mouvement virtuel avec le temps de chaque monomère de l'extrémité barbée vers l'extrémité pointée à mesure que la cellule avance. Ce mouvement a directement été observé à l'aide de monomères d'actine fluorescents (Fujiwara et al., 2002). Ce mouvement des monomères d'actine, d'une extrémité à l'autre du filament, est appelé treadmilling ou mouvement de tapis roulant (Pollard and Borisy, 2003). Notons que l'hydrolyse de l'ATP n'est pas requise pour former le filament. Cette hydrolyse sert à affaiblir les liaisons dans le polymère et donc favorise la dépolymérisation. Le mouvement de tapis roulant est un mécanisme de non-équilibre requérant un apport d'énergie, apport procuré par l'hydrolyse de l'ATP qui accompagne le treadmilling. Ainsi, l'hydrolyse de l'ATP rend possible l'assemblage et le désassemblage dynamiques des filaments d'actine (toutes ces considérations sont aussi valables pour les microtubules).

6.6.1.5 Les protéines qui interagissent avec l'actine

Beaucoup de protéines interagissent avec l'actine, on peut les classer en 6 grandes classes :

- **les protéines qui séquestrent l'actine globulaire (sequestering proteins)** (Fig. 6_11_A) :

Ce sont des protéines qui abaissent la concentration d'actine libre (G-actine) au voisinage de la concentration critique. Elles permettent donc de constituer un réservoir d'actine, grâce à leur concentration de l'ordre de 0.5 M. Ce réservoir est rapidement disponible grâce à leur faible affinité avec les monomères d'actine ($K_d = 0.7 \mu\text{M}$) (De La Cruz et al., 2000). La thymosine β_4 fait partie de ces protéines. Elle n'est pas présente chez *D. discoideum*.

- **Les protéines qui aident la nucléation de filaments d'actine** (Fig. 6_11_B) :

Ces protéines se lient à plusieurs unités d'actine et les positionnent de façon à engendrer la croissance d'un nouveau filament ou d'une nouvelle branche sur un filament existant afin d'accélérer la capacité intrinsèque de l'actine à former de nouveaux filaments. Par exemple, citons le complexe Arp2/3, la protéine N-Wasp, les formines.

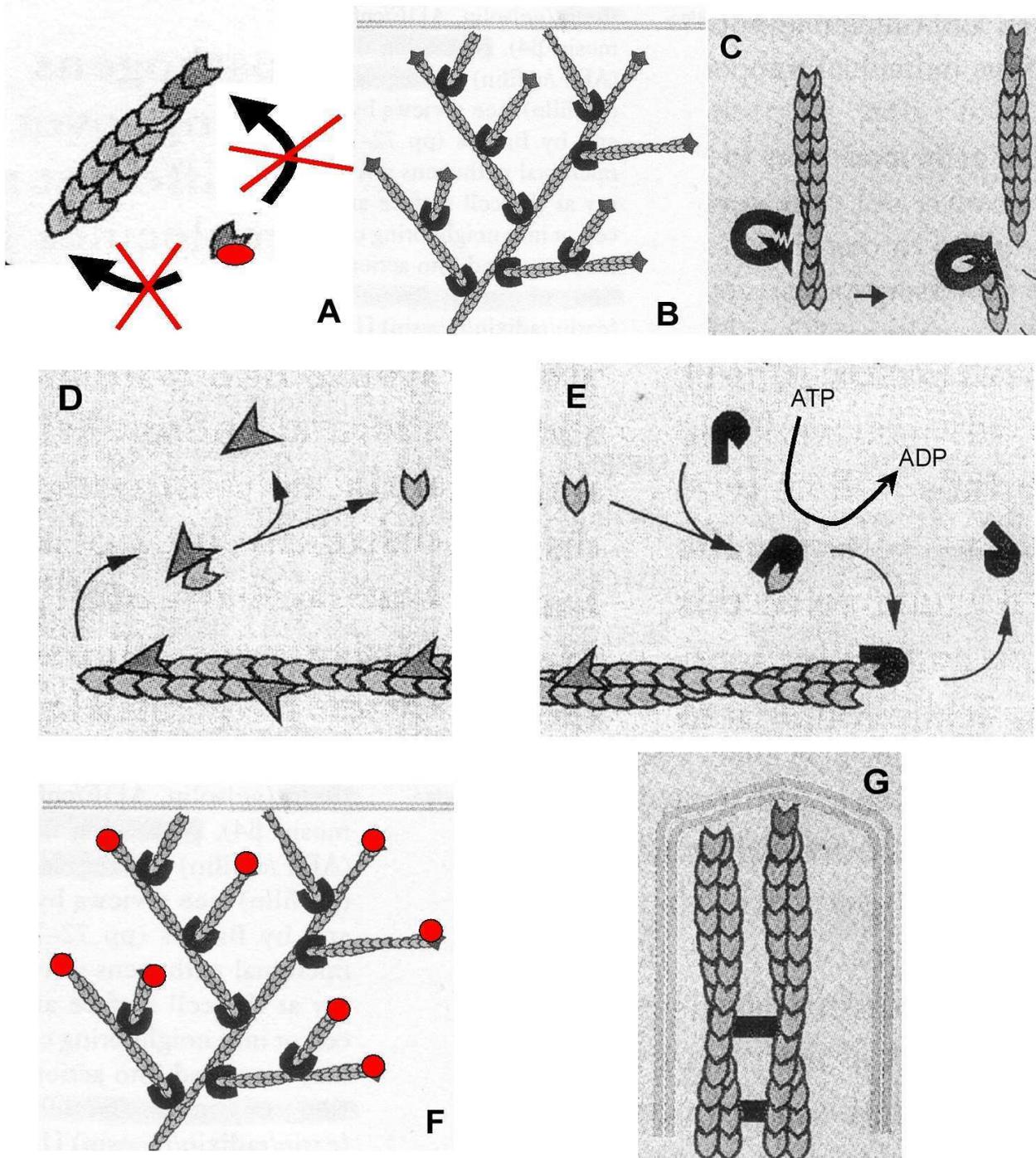


Figure 6_11: Les protéines de liaison à l'actine. **A)** Une protéine (rouge) séquestre une sous-unité d'actine globulaire. **B)** Protéines de nucléation (représentées en forme de U), comme le complexe Arp2/3. **C)** Protéine de coupe. **D)** Une protéine (pointeur) coupe les filaments d'actine et favorise la dépolymérisation du côté pointé (exemple: l'ADF/cofiline). **E)** La profiline empêche la sous-unité globulaire d'actine de se réassocier à l'extrémité pointée du filament, favorise l'échange de l'ADP en ATP et favorise la liaison de la sous-unité à l'extrémité barbée du filament. **F)** Protéine de coiffe (rouge): elle sélectionne les filaments qui poussent et coiffent les autres (exemple: la gelsoline). **G)** Protéine de réticulation. Elle fait le lien entre plusieurs filaments d'actine. Ici est illustrée une bundling protéine (adaptés de Borisov and Svitkina, 2000).

- **Les protéines de coupe ou de fragmentation** (severing proteins) (Fig. 6_11_C et D) : Citons l'ADF/cofiline qui accélère la dépolymérisation des filaments d'actine à l'extrémité pointée du filament (Theriot, 1997). L'ADF/cofiline se lie à la F-actine-ADP pour couper les filaments d'actine.

- **Une protéine, la profiline, qui lie la G-actine et accélère l'échange de l'ADP en ATP** (Fig. 6_11_E) :

En favorisant l'échange de l'ADP en ATP au niveau d'une sous-unité de G-actine, la profiline favorise la liaison de cette sous-unité à l'extrémité barbée d'un filament. Elle se lie étroitement aux phospholipides inositol de la membrane plasmique.

- **Les protéines de coiffe (capping proteins)** (Fig. 6_11_F) :

Parmi ces protéines, la gelsoline coiffe les filaments d'actine à l'extrémité barbée et empêche donc leur élongation. Elle fragmente aussi les filaments d'actine lorsqu'elle est activée par les ions calcium. En limitant localement la croissance des filaments et donc leur taille, la gelsoline favorise la nucléation de nouveaux filaments d'actine et entraîne donc la densification du cytosquelette d'actine. Au lieu d'avoir peu de longs filaments, la gelsoline favorise l'apparition de nombreux filaments plus courts. On trouve des concentrations importantes de gelsoline dans les zones où la dynamique du cytosquelette d'actine est intense, comme dans les protrusions (Condeelis, 1993).

- **Les protéines de réticulation (cross-linking proteins)** (Fig. 6_11_G) :

Ces protéines lient les filaments d'actine entre eux. Elles peuvent également lier les filaments à d'autres structures cellulaires comme la membrane plasmique. Ces protéines permettent divers types de liaisons : soit les filaments liés se croisent, soit ils sont parallèles et forment alors un faisceau parallèle de filaments, on parle alors de bundling proteins.

Beaucoup d'autres protéines interagissent avec le cytosquelette d'actine, avec des rôles dans de nombreuses voies de signalisation. En particulier, citons la protéine DdLimE¹ que j'utiliserai dans mes expériences pour marquer l'actine. DdLimE est une protéine qui est localisée au niveau du cortex cellulaire et dans les protrusions dynamiques et riches en actine (front avant, coupes de phagocytose et de macropinocytose, régions polaires des cellules en division) (Prassler et al., 1988). Elle s'associe avec la forme activée de Rac1 (une protéine de la famille des petites RhoGTPases, qui interagissent de façons nombreuses et variées avec le

¹ Dd pour *Dictyostelium discoideum*

cytosquelette d'actine) dans une voie de signalisation qui mène à la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes. DdLimE joue aussi un rôle dans la régulation du réseau de microtubules et pourrait lier le réseau cortical d'actine aux microtubules (Schneider et al., 2003). C'est une protéine très utile pour marquer l'actine parce que le signal de fluorescence de la fusion DdLimE- Δ CC-GFP (notée indifféremment Lim-GFP dans la suite) est beaucoup moins bruité que celui de la GFP-actine (Fig. 6_12). Elle permet de marquer la polymérisation dendritique ainsi que les filaments d'actine sur la surface ventrale des cellules (Diez et al., 2005).

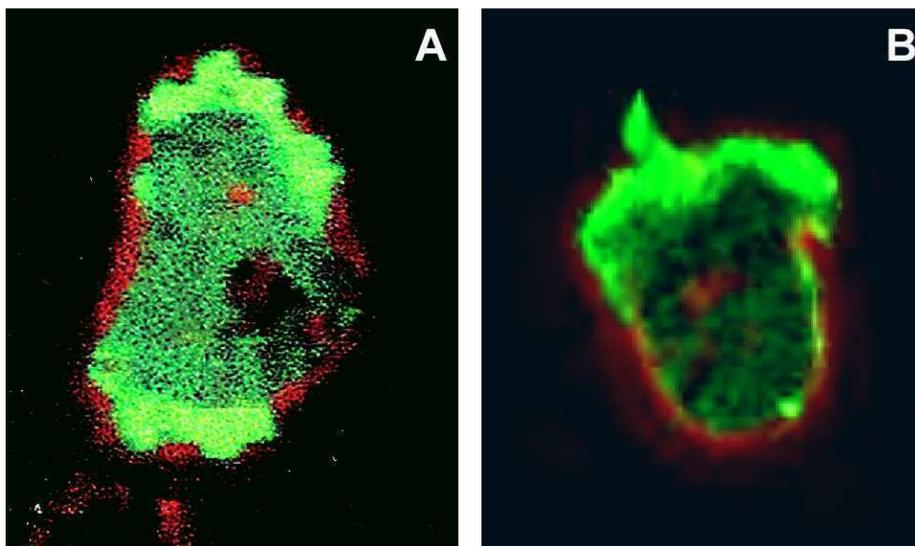


Figure 6_12: Marqueurs fluorescents dans les cellules *Dictyostelium discoideum*.

A) Cellule exprimant la GFP-actine (tiré de Weber et al., 2002). **B)** Cellule exprimant la Lim-GFP.

En rouge, le contour cellulaire en contraste de phase. En vert, la fusion avec la GFP.

Le fond de fluorescence est beaucoup plus important pour la GFP-actine que pour la Lim-GFP.

Toutes les protéines de liaison à l'actine entrent en jeu dans un équilibre d'interactions coopératives et compétitives. Des combinaisons différentes d'interactions coopératives et compétitives peuvent donner lieu à des arrangements différents de filaments d'actine spatialement différenciés dans un cytoplasme commun. Pour avoir une idée vaste et complète de l'ensemble des protéines du cytosquelette d'actine de *Dictyostelium*, vous pouvez consulter la revue d'Eichinger et al. (1999; Fig. 6_13).

Actin-binding proteins in *Dictyostelium*

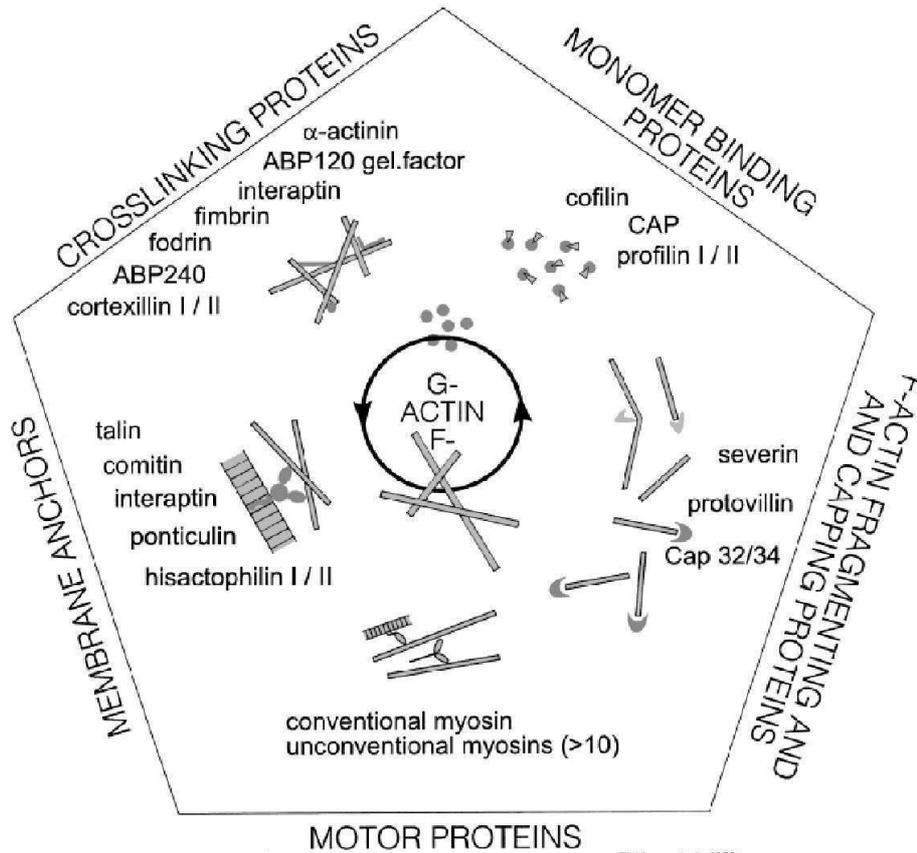


Figure 6_13: Protéines typiques de liaison à l'actine chez *Dictyostelium* (tiré de Eichinger et al., 1999).

6.6.1.6 La nucléation et la création de nouvelles terminaisons barbées

Pour créer de nouvelles terminaisons barbées, trois mécanismes sont possibles : soit couper des filaments existants à l'aide de protéines telles la gelsoline, l'ADF/cofiline, ou la severine, soit décoiffer des filaments existants, soit -et c'est ce mécanisme qui semble être le mécanisme dominant au front avant- créer de nouvelles extrémités (Condeelis, 1993; Zigmond, 1996). On comprend donc le rôle des protéines de nucléation tel le complexe Arp2/3 qui favorisent la formation d'extrémités barbées.

Ce complexe Arp2/3 est constitué de sept protéines dont deux protéines apparentées à l'actine : Arp2 et Arp3 (Machesky et al., 1994; Kelleher et al., 1995) et se trouve en très grandes concentrations, presque 10 μ M, dans le cytoplasme de leucocytes humains (Higgs et al., 1999). Il est recruté au front avant d'une variété de types cellulaires mais se trouve aussi de manière ponctuelle à l'interface cellule-substrat (Machesky et al., 1997; Welch et al., 1997; Mullins et al., 1997; Bretschneider et al., 2004). In vitro, le complexe Arp2/3 peut coiffer

l'extrémité pointée des filaments d'actine et stabiliser l'extrémité barbée mais surtout il se lie aux côtés des filaments en formant des branchements à 70° (en forme de Y ; Fig. 6_14). C'est cette propriété qui donne lieu à la croissance dendritique.



Figure 6_14: Galerie de filaments d'actine branchés, polymérisés en présence de N-WASP et du complexe Arp2/3 (tiré de Carlier et al., 2003).

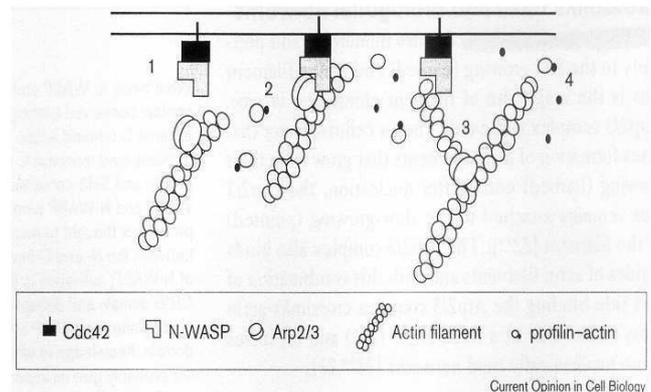


Figure 6_15_A: Polymérisation de l'actine médiée par les protéines G. Modèle de nucléation dendritique.

(1) Une petite RhoGTPase, par exemple, Cdc42, activée, recrute à la membrane une protéine de la famille WASP (par exemple N-WASP), qui elle-même recrute le complexe Arp2/3 et l'active (2). Le complexe Arp2/3 nuclée la polymérisation d'un nouveau filament qui est branché sur le côté d'un filament pré-existant (3). On a donc un couplage entre formation d'un filament et réticulation : cela correspond au modèle de nucléation dendritique (tiré de Mullins, 2000).

Le complexe Arp2/3 seul est peu actif et il est activé soit par la protéine ActA dans le cas de *Listeria*, soit par les protéines de la famille WASP chez les eucaryotes (Machesky et al., 1999). Cette famille consiste en WASP, N-WASP et SCAR. WASP (N-WASP également) possède un domaine de liaison au PI(4,5)P₂ (phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate), un à Cdc42, une petite protéineG de la famille des RhoGTPases, un à l'actine et un au complexe Arp2/3 (Fig. 6_15_A). L'activation de Cdc42 par des signaux extracellulaires et sa liaison à N-WASP provoque l'activation de N-WASP grâce à l'adoption d'une conformation dépliée (Fig. 6_15_B ; Machesky and Insall, 1998; Pollard and Borisy, 2003). N-WASP favorise la nucléation dendritique en formant un complexe avec Cdc42, le complexe Arp2/3 et une sous-unité d'actine liée à la profiline (Fig. 6_15_A ; Mullins, 2000). Cdc42 est donc le lien entre les signaux extracellulaires et la croissance de filaments d'actine.

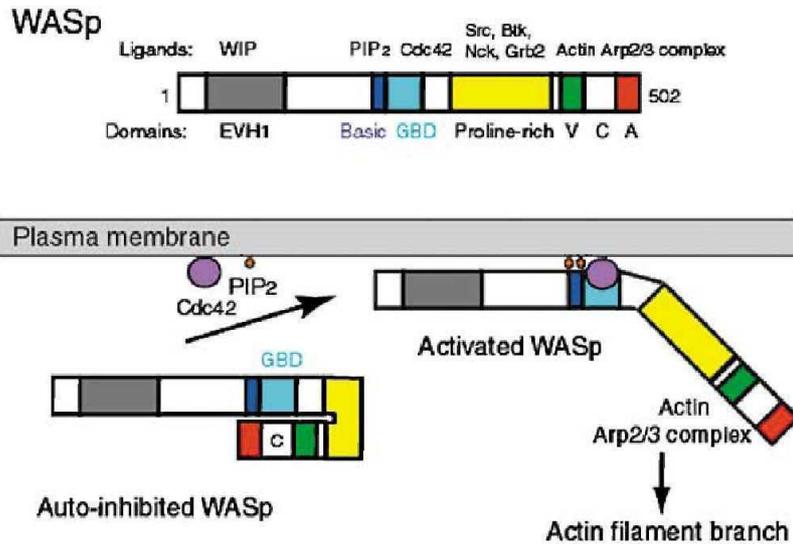


Figure 6_15_B:
Régulation de WASP.
 L'activation de Cdc42 et sa liaison à WASp provoque l'activation de WASp grâce à l'adoption d'une conformation dépliée. Ce dépliement libère des domaines de liaison à l'actine et au complexe Arp2/3 (tiré de Pollard and Borisy, 2003).

6.6.1.7 Modèle de nucléation dendritique avec treadmilling

On aboutit donc au modèle de nucléation dendritique avec treadmilling illustré dans la Figure 6_16 (Pollard et al., 2001). Dans ce modèle, la croissance est déterminée par la concentration de sous-unités de G-actine disponibles. A l'état stationnaire, l'équilibre des masses provoque que la croissance du côté barbé est forcément limitée par la dissociation des sous-unités du côté pointé. Ce processus de dissociation pour des filaments de pure actine est lent, de l'ordre de 0.2 s^{-1} , ce qui correspond à $0.04 \mu\text{m}/\text{min}$, c'est-à-dire deux ordres de grandeur plus lent que les vitesses observées pour certains types cellulaires. C'est pourquoi l'ADF/cofiline et la profiline sont deux composants nécessaires qui vont accélérer la dissociation du côté pointé. L'ADF/cofiline se lie aux filaments constitués d'actine-ADP et à l'état stationnaire accroît d'un facteur 25 la vitesse de dissociation du côté pointé, accélérant ainsi le turnover des filaments d'actine (Carlier et al., 1997; Theriot, 1997). L'ADF/cofiline peut aussi simplement couper les filaments. La dissociation de l'ensemble ADF/cofiline liée à la G-actine de l'extrémité pointée étant réversible, est-il possible d'éviter la réassociation du côté pointé ? C'est là qu'intervient la profiline, protéine cytoplasmique qui se lie principalement à l'actine soluble. In vitro, la profiline se lie à la forme ADP de la G-actine et accélère l'échange de l'ADP pour l'ATP (elle a une affinité plus grande pour l'actine-ATP) (Pantaloni and Carlier, 1993). Le complexe profiline-actine a la propriété unique de se lier à et d'allonger l'extrémité barbé d'un filament sans pouvoir se lier à l'extrémité pointée. La profiline a aussi la propriété d'empêcher la nucléation spontanée, c'est-à-dire qu'elle joue aussi un rôle de protéine de séquestration.

Ainsi, la profiline et l'ADF/cofiline agissent de manière synergique et fournissent des sous-unités d'actine capables de se lier uniquement du côté barbé des filaments, permettant

d'augmenter de 75 à 125 fois la vitesse de treadmilling (Didry et al., 1998). Pour que les vitesses de polymérisation atteintes avec l'ensemble de protéines (actin, Arp2/3, N-WASP,

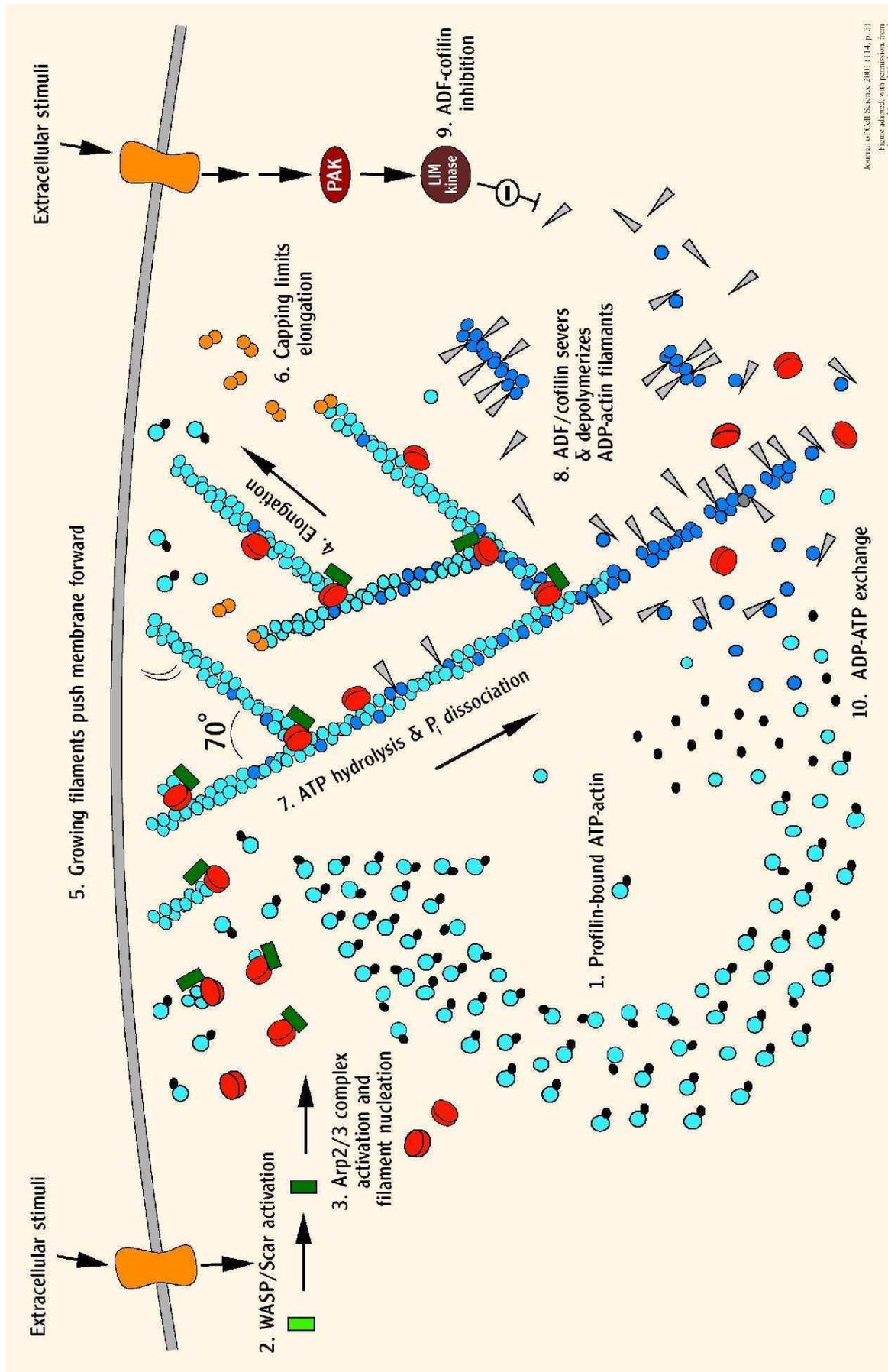


Figure 6_16: Modèle de nucléation dendritique avec treadmilling (tiré de Pollard et al., 2001).

profiline, ADF/cofiline) égalent les vitesses physiologiques observées, il est encore nécessaire d'intégrer des protéines de coiffe (capping proteins). L'utilisation de constructions GFP a permis de montrer la colocalisation de protéines de coiffe et du complexe Arp2/3 au niveau de lamellipodes actifs (Schafer et al., 1998). Les protéines de coiffe ont pour rôle de contrôler là où les filaments d'actine doivent pousser, elles opèrent donc une sélection des filaments. Un mouvement généré par la polymérisation de l'actine va coiffer les extrémités barbées globalement et permettre la libération de certaines extrémités barbées localement (Fechheimer and Zigmond, 1993).

Récemment, de nouvelles protéines de nucléation des filaments d'actine ont été découvertes. Ce sont les formines (Zigmond, 2004).

6.6.1.8 Régulation des protéines se liant à l'actine

Parmi les régulateurs principaux des protéines se liant à l'actine, on trouve le calcium Ca^{2+} , les phospholipides (Forscher, 1989 ; Janmey, 1994), les protéines de la famille des RhoGTPases (Rac, Rho, Cdc42, Ras, ... ; Hall, 1998), la phosphorylation (en particulier tyrosine phosphorylation ; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1994 ; Glogauer et al., 1997), le pH.

6.6.1.9 Tests biomimétiques

De nombreux tests biomimétiques in vitro ont permis d'induire la polymérisation de l'actine et de générer, dans un milieu reconstitué, le mouvement de microsphères sur lesquelles sont greffées des protéines comme ActA ou une protéine de la famille WASP (éventuellement un sous-domaine) (Cameron et al., 1999 ; van Oudenaarden and Theriot, 1999 ; Bernheim-Groswasser et al., 2002 ; Marcy et al., 2004). De façon similaire, il a été montré qu'un jeu minimal de 5 protéines (actine, Arp2/3, gelsoline, ADF et N-WASP) permet, en présence d'ATP, la génération de forces propulsant des billes recouvertes de N-WASP, grâce à la polymérisation de l'actine (Wiesner et al., 2003 ; Fig. 6_17). Ainsi, tous ces systèmes reconstitués miment le mouvement de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

6.6.1.10 L'avancée du front avant : besoin d'un apport de membrane

Un autre aspect dans la formation de protrusions est le nécessaire apport de membrane au front avant. Chez *Physarum*, il a été mis en évidence que la protrusion du front avant

suivait l'exocytose d'une vésicule (Fig. 6_18 ; Sesaki and Ogihara, 1997). Il a également été montré dans des cellules Walker carcinosarcoma que la formation de blebs était engendrée par l'exocytose de vésicules (Keller and Bebie, 1996). Ainsi, l'extension du front avant est souvent considérée comme permise par l'exocytose d'une surface équivalente de membrane, on parle de cycle d'endocytose polarisé (Fig. 6_19 ; Bretscher and Aguado-Velasco, 1998). Chez *Dictyostelium*, le temps pour récupérer, après internalisation, un marqueur lipidique de la membrane plasmique est de 10 à 20 minutes (Thilo and Vogel, 1980).

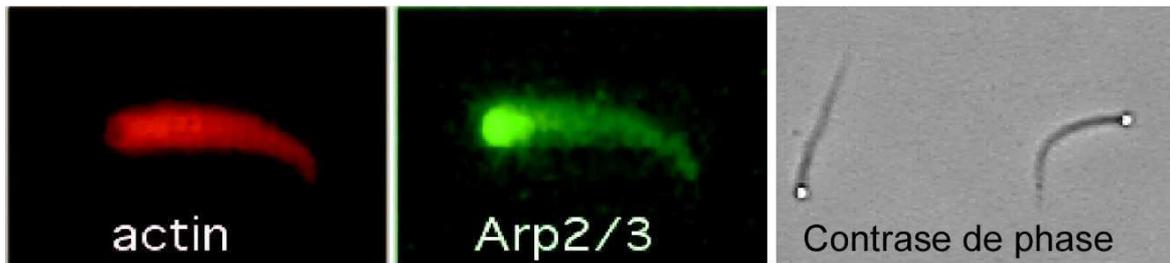


Figure 6_17: Tests biomimétiques in vitro. Un jeu minimal de 5 protéines (actine, Arp2/3, gelsoline, ADF et N-WASP) permet, en présence d'ATP, de générer des forces de propulsion sur des billes recouvertes de N-WASP. Cette reconstitution mimique la motilité de *Listeria Monocytogenes* (Tiré de Wiesner et al., 2003).

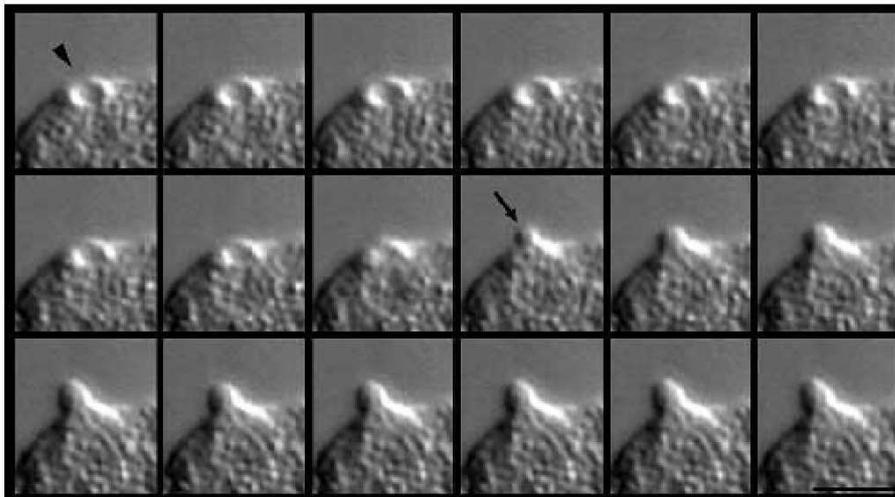


Figure 6_18: Chez *Physarum*, il a été mis en évidence que la protrusion du front avant suivait l'exocytose d'une vésicule. Le pointeur indique la vésicule. La flèche indique la protrusion. (Tiré de Sesaki and Ogihara, 1997).

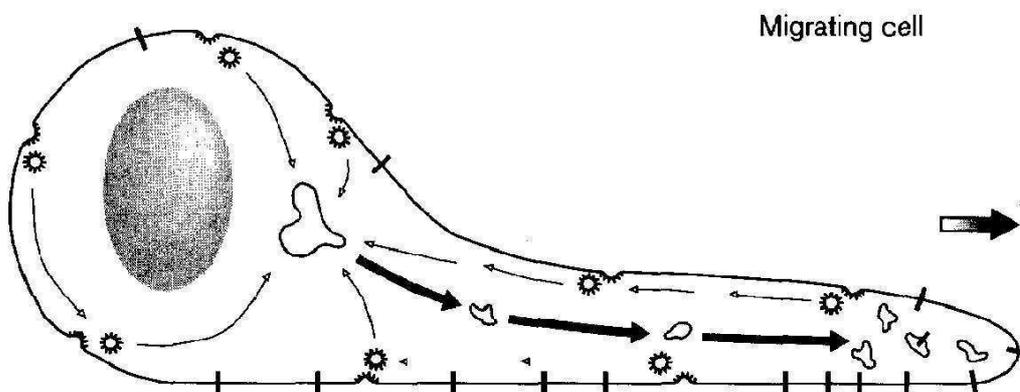


Figure 6_19: Cycle d'endocytose polarisée. L'endocytose de membrane à l'arrière et le transport au front avant des vésicules fournissent un apport de membrane au front avant où peut avoir lieu de l'exocytose (tiré de Bretscher and Aguado-Velasco, 1998). La flèche indique la direction de migration cellulaire.

6.6.2 La deuxième étape dans la migration cellulaire : l'adhésion des protrusions au support

6.6.2.1 Concepts généraux

a) Deux types d'approches

Pour pouvoir exercer une force et donc être motile sur un support, une cellule doit nécessairement adhérer à ce support. La migration cellulaire dépend donc de manière cruciale de l'interaction cellule-support. Les contacts cellulaires avec le substrat doivent être continuellement établis et détruits tandis que la cellule se déplace vers l'avant.

Un grand nombre de résultats expérimentaux ont été obtenus concernant l'adhésion cellulaire. Cependant, mesurer l'adhésion cellule-support reste très complexe et se pose alors la question de savoir comment caractériser et quantifier cette interaction. D'abord, parce qu'une cellule dispose souvent de plusieurs types de molécules d'adhésion et pour chaque type, le nombre de ces molécules est important et la répartition variable sur la membrane. Un deuxième point qui rend compliquée cette mesure est que le cytosquelette exerce lui-aussi des forces sur les liens adhésifs, forces qui dépendent de la contrainte appliquée par l'expérimentateur. Nous reparlerons de la notion de renforcement des liens adhésifs dans la section « *Réponse des cellules à l'application de forces extérieures, mécanosensibilité* ». Cela ajoute donc une contribution interne mal connue aux forces totales mises en jeu.

Deux approches différentes ont donc émergé prenant en compte ces difficultés, leur but commun étant de remonter aux propriétés adhésives à la fois des protéines en tant qu'entité adhésive et des cellules en tant que système intégré complexe. Dans le cadre d'une première approche simplifiée du système cellule, des travaux ont porté sur l'étude du comportement adhésif de systèmes biomimétiques, comme des billes ou des vésicules sur lesquelles étaient greffées des protéines d'adhésion (Cozens-Roberts et al., 1990; Wattenbarger et al., 1990; Kuo and Lauffenburger, 1993; Pierres et al., 1996). Cette simplification permet d'effectuer des mesures de forces, de fréquences d'arrêts adhésifs et d'affinités sur molécules uniques. L'autre approche considère la cellule dans toute sa complexité et vise à étudier directement le comportement de la cellule à l'échelle macroscopique, en exerçant des forces sur celle-ci. Les techniques de mesures directement sur les cellules en adhésion sur un substrat ou avec une autre cellule ont le mérite, par rapport à celles sur molécules uniques, de sonder le comportement adhésif de systèmes intégrés, dans un environnement plus ou moins proche de leur environnement physiologique naturel, mais

sont donc globalement plus compliquées à interpréter. Dans les deux cas, pour obtenir des informations quantitatives concernant l'adhérence entre deux objets, il est nécessaire d'appliquer des forces extérieures à au moins l'un de ces objets, et de nombreuses techniques expérimentales ont été développées et sont aujourd'hui d'usage courant (chambre à flux, cantilever (AFM), succion par micropipette, centrifugation, ...).

b) Suffisamment d'adhérence mais pas trop

Dans une étude mesurant la vitesse de migration de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ainsi que la force moyenne de détachement cellulaire à l'aide d'une chambre appliquant une contrainte de cisaillement hydrodynamique, Palecek et al. (1997) ont montré que la vitesse de migration cellulaire était maximale pour une force moyenne de détachement du substrat comprise entre 20 et 40 nN et ce quels que soient le niveau d'expression des intégrines, la concentration de ligands ou l'affinité de liaison intégrine-ligand (Fig. 6_20). En faisant l'hypothèse que cette force moyenne de détachement est proportionnelle au nombre de liens cellule-substrat, ce résultat traduit donc l'existence d'un optimum d'adhésion qui correspond à un maximum de la vitesse de migration. Ainsi l'adhésion cellule-substrat apparaît comme un paramètre unificateur affectant la migration cellulaire et ce, quelles que soient les variations de propriétés moléculaires variées. Ces résultats permettent d'illustrer l'importance de l'adhérence cellulaire dans la motilité. Cet article traduit l'idée intuitive selon laquelle une trop grande adhérence cellule-substrat empêche la migration probablement en empêchant la rétraction de l'arrière (cas extrême d'une cellule sur une surface de super-glu). A l'autre extrême, une trop faible adhérence ne permet pas non plus d'atteindre des vitesses de migration maximales. Dans ce cas, la probabilité de former un point stable d'attachement à la surface est faible (cas extrême d'une cellule sur une patinoire)².

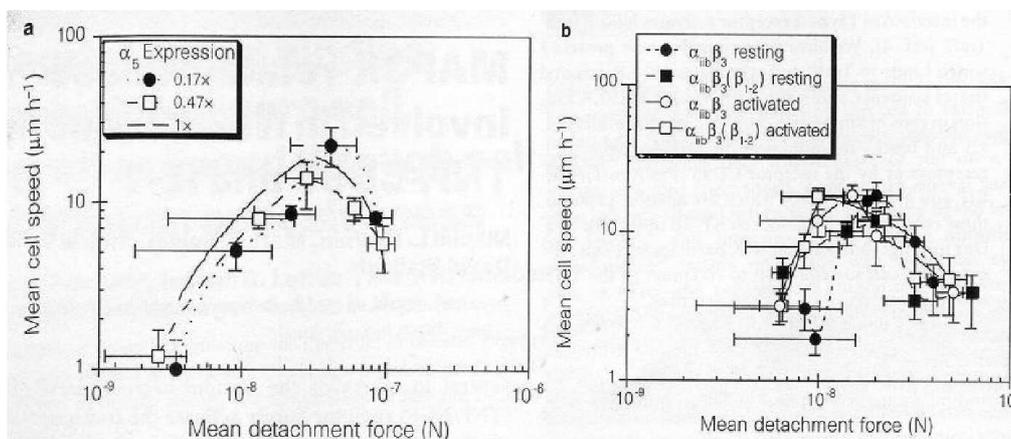


Figure 6_20: La migration cellulaire dépend de manière cruciale de l'interaction cellule-substrat. La force moyenne de détachement du substrat apparaît comme un paramètre unificateur pour établir les conditions de migration maximale. Quelles que soient les valeurs de tout un ensemble de paramètres, si cette force de détachement vaut environ 20 à 40 nN, alors les cellules CHO migrent avec une vitesse maximale (tiré de Palecek et al., 1997).

² Remarque : une faible adhérence affecte aussi les nouvelles protrusions qui sont, par expérience, souvent plus petites et moins fréquentes.

6.6.2.2 L'adhésion chez *Dictyostelium discoideum*

Pour générer une adhérence suffisamment forte, les cellules doivent produire des protéines membranaires d'adhésion qui se lient au substrat de façon discrète. Concernant l'amibe *D. discoideum*, de nombreuses études ont identifié un certain nombre de protéines d'adhésion ou de structures adhésives et des mesures quantitatives de forces de détachement ont été réalisées. Il est à noter que les molécules d'adhésion de l'amibe ne sont pas les mêmes selon que les cellules sont végétatives ou agrégation-compétentes (Bozzaro and Ponte, 1995).

Sur la base d'expériences de phagocytose réalisées avec différents substrats de natures physico-chimiques variées, un modèle de reconnaissance chez *Dictyostelium* a été proposé (Vogel et al., 1980) incluant :

- un récepteur de type lectine qui médie la liaison spécifique avec des particules contenant un glucose terminal (probablement gp130, voir plus bas)
- une deuxième classe de récepteurs non spécifiques qui permettent la liaison avec une variété de particules par interactions hydrophobes.

Une glycoprotéine de la membrane plasmique de 130 kDa, nommée gp130, joue un rôle lors de la phagocytose et dans l'adhésion au substrat de cellules végétatives. Cette protéine fait partie des contact sites B, protéines d'adhésion dépendant de la concentration d'EDTA (Chia, 1996; Chia et al., 2005). Une glycoprotéine de poids moléculaire proche, gp126, joue également un rôle lors de la phagocytose et dans l'adhésion au substrat dans la phase végétative. Elle est aussi impliquée dans la cohésion cellule-cellule et régule la taille des agrégats durant la morphogénèse (Chadwick et al., 1984). Il est probable que gp126 et gp130 soient la même protéine.

Une autre protéine qui joue un rôle dans l'adhésion de cellules végétatives, SadA, a récemment été identifiée comme une molécule d'adhésion cellule-substrat (Fey et al., 2002).

D'autres protéines d'adhésion sont spécifiques de la phase d'agrégation, comme les glycoprotéines csA (pour contact sites A; Bozzaro and Ponte, 1995). Ces csA sont résistantes à de fortes concentrations d'EDTA. Un exemple est gp80 (parfois aussi appelée abusivement csA) qui pourrait faire partie de la superfamille des immunoglobulines (Müller and Gerisch, 1978; Desbarats et al., 1994). Une autre protéine, gp24 (aussi appelée DdCAD-1), qui joue un rôle dans l'adhésion cellule-cellule, fait partie de la famille des cadhérines et est exprimée dans les phases initiales de développement (Knecht et al., 1987; Wong et al., 1996). Enfin, gp150, est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellule-cellule dans les étapes tardives de développement (Gao et al., 1992; Wang et al., 2000).

Des expériences utilisant une technique adaptée de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) avec un marqueur fluorescent du volume extracellulaire ont suggéré que la distance séparant la surface ventrale de *D. discoideum* et le substrat était relativement uniforme sous toute la cellule (Todd et al., 1988). Ceci va à contre sens de la présence de zones discrètes d'adhésion bien différenciées. Le même groupe a rapporté chez *Dictyostelium* un mécanisme de formation de très fine lamelle (de l'ordre de 100 nm d'épaisseur) en contact rapproché avec le substrat. Une condition pour voir apparaître cette fine lamelle est que le substrat montre une grande adhésivité avec la cellule, comme un substrat recouvert de poly-L-lysine (Owens et al., 1988; Gingell and Owens, 1992).

Fukui et Inoue (1997) ont découvert et décrit chez *Dictyostelium* de nouvelles structures adhésives. Ces nouvelles structures sont riches en F-actin, myoB (un membre de la famille des myosines-I de *D. discoideum*, voir la partie consacrée à « la production de forces ») et α -actinine (une protéine qui se lie à l'actine et joue un rôle de protéine de réticulation (Rivero et al., 1999)). Ces structures n'étant pas observées dans d'autres organismes, les auteurs les ont nommées « eupodia » et les ont proposées comme possibles « pieds » de *Dictyostelium* (Fig. 6_21). En effet, ils ont montré que ces eupodia, qui mesurent environ 1 μm de diamètre et apparaissent transitoirement et en nombre à la base de certains pseudopodes, ont un rôle dans l'ancrage à un substrat d'agarose. Ces eupodia n'apparaissent que lorsque les cellules sont sous pression, entre une couche d'agarose et une lamelle et pourraient fournir un support mécanique à une protrusion avançant dans un espace restreint (Fukui et al., 1999).

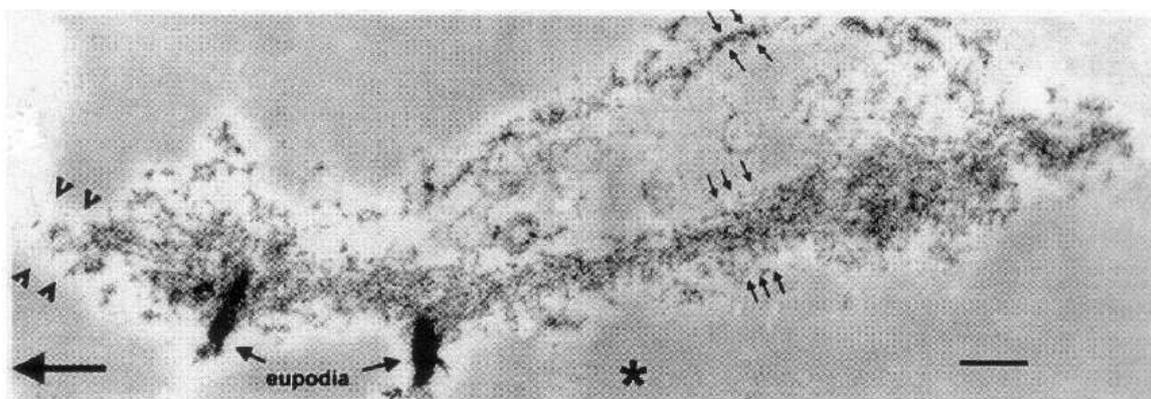


Figure 6_21: Les eupodia. Micrographie par transmission électronique montrant des eupodia et le réseau d'actine dans une cellule perméabilisée. L'astérisque situe l'agarose qui comprime la cellule. La grande flèche indique la direction de la protrusion. Les petites flèches indiquent le réseau d'actine filamenteuse dans la lamellipode (pointeurs), sur la surface dorsale (doubles flèches) et ventrale (triples flèches) (tiré de Fukui et al., 1999).

Enfin, d'autres candidats plus convaincants pour jouer le rôle de « pieds » de l'amibe *Dictyostelium* sont les foyers d'actine (ou actin foci). Ces foyers d'actine sont présents sur la surface ventrale des cellules *D. discoideum* migrant librement sur un substrat et sont des points de convergence de nombreux filaments d'actine (Yumura and Kitanishi-Yumura, 1990 ; Fig. 6_22_A, B et C). Ce sont des structures d'environ 0.5 μm de diamètre qui apparaissent transitoirement (moyenne du temps de vie de 20 sec) et restent fixes par rapport au substrat. En utilisant simultanément les techniques de microscopie confocale et RICM, il a été montré que la surface ventrale des cellules était plus proche du substrat là où apparaissaient les foyers d'actine (Uchida and Yumura, 2004 ; Fig. 6_22_D), ce que les études du groupe de Gingell n'avaient pas pu montrer. De plus, en utilisant un substrat flexible de silicone, les mêmes auteurs ont prouvé que les forces de traction exercées par les cellules étaient transmises au substrat uniquement aux alentours des foyers d'actine.

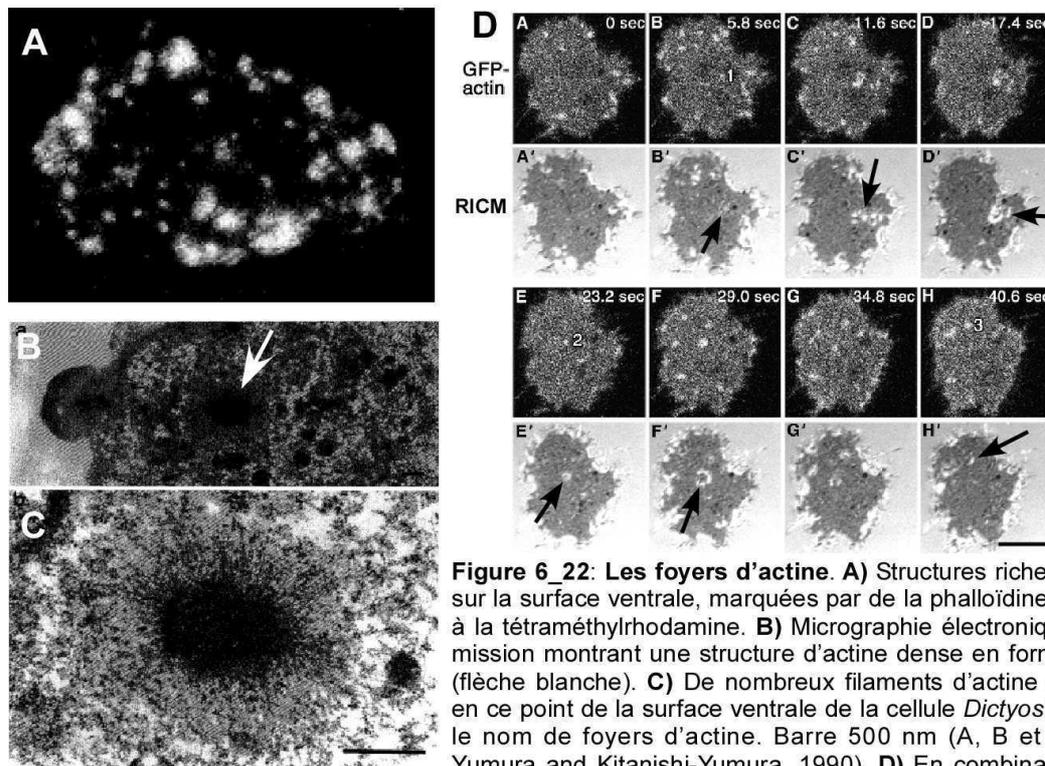


Figure 6_22: Les foyers d'actine. A) Structures riches en actine sur la surface ventrale, marquées par de la phalloïdine conjuguée à la tétraméthylrhodamine. B) Micrographie électronique à transmission montrant une structure d'actine dense en forme de point (flèche blanche). C) De nombreux filaments d'actine convergent en ce point de la surface ventrale de la cellule *Dictyostelium*, d'où le nom de foyers d'actine. Barre 500 nm (A, B et C tirés de Yumura and Kitanishi-Yumura, 1990). D) En combinant RICM et fluorescence, il apparaît que ces foyers d'actine sont plus proches du substrat que le reste de la surface ventrale (voir flèches noires ; tiré de Uchida and Yumura, 2004).

D'autre part, il est aussi à noter que les aires de contact ne sont pas les mêmes selon que la cellule est végétative ou en phase de développement. Dans le cas d'une cellule végétative, on a souvent une grande surface en contact avec le substrat, visualisée par RICM (Fig. 6_23_A et B ; Weber et al., 1995). Ainsi la surface projetée de la cellule est quasi égale à la surface de contact. Au contraire, pour une cellule agrégation-compétente (Fig. 6_23_C et D), on a souvent plusieurs petites surfaces d'adhésion. Entre ces surfaces, la cellule n'adhère

pas au substrat. L'amibe peut aussi émettre des protrusions qui évoluent quelques microns au-dessus du substrat sans rentrer en contact avec ce dernier.

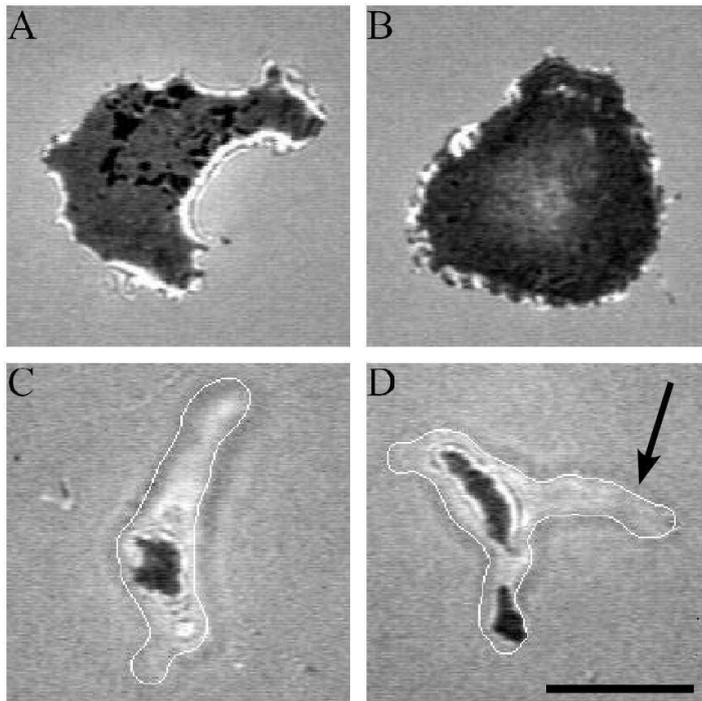


Figure 6_23: Les cellules végétatives *Dictyostelium* ont des surfaces de contact au substrat plus grandes (A, B) que les cellules agrégation-compétentes (C, D).

Combinaisons de photographies en contraste de phase et en RICM. Le contour en forme de ligne blanche indique le contour cellulaire. Les zones sombres (visualisées en RICM) sont les régions d'étroite proximité entre la cellule et le substrat (tiré de Weber et al., 1995). L'amibe peut émettre des protrusions qui évoluent quelques microns au-dessus du substrat sans rentrer en contact avec ce dernier (flèche noire dans panel D).

Des mesures de l'adhésion cellule-cellule avec des amibes *Dictyostelium* agrégation-compétentes à l'aide d'un cantilever ont abouti à une force de détachement de 23 ± 8 pN à un taux de séparation de $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, correspondant à une rampe de force d'environ $100\text{-}500 \text{ pN}\cdot\text{s}^{-1}$ selon l'élasticité cellulaire (Benoit et al., 2000). Cette force de détachement correspond à la rupture du dernier lien entre les deux cellules. Associées à des manipulations génétiques, ces mesures ont permis d'établir que cette force de détachement correspondait principalement à une liaison entre deux molécules de csA.

6.6.2.3 Complexes focaux et adhésions focales chez les eucaryotes supérieurs

Comme nous l'avons vu avec les foyers d'actine chez *Dictyostelium*, en général, les cellules adhèrent à un substrat en formant des liens discrets séparés les uns des autres. Chez les eucaryotes supérieurs (dans les fibroblastes, les kératocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales notamment), les structures adhésives ont beaucoup été étudiées et il apparaît que des assemblages protéiques, les complexes focaux, qui deviennent après maturation les contacts focaux (aussi appelés adhésions focales), constituent les sites d'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire ou à un substrat (Burrige et al., 1988 ; Fig. 6_24_A). Ces sites d'ancrage relient le cytosquelette cellulaire à l'ECM (matrice extracellulaire). Chaque contact

focal est situé à quelques dizaines de nanomètres de la matrice. Au centre de ces structures adhésives, on trouve les intégrines, protéines transmembranaires, qui sont le lien entre les protéines de l'ECM, la membrane plasmique et le complexe protéique lié aux filaments d'actine (Fig. 6_24_B). Les intégrines sont composées de deux chaînes polypeptidiques, les α - et β -intégrines, qui font office de liens transmembranaires dans beaucoup de types cellulaires (Hynes, 1992). Le domaine extracellulaire de l'intégrine se lie à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la vitronectine. A l'autre extrémité, le domaine cytoplasmique de l'intégrine est associé à un nombre important de protéines en particulier du cytosquelette. Parmi les protéines de ces sites d'ancrage, citons l' α -actinine, la taline, la vinculine, la paxilline et la FAK (Focal Adhesion Kinase).

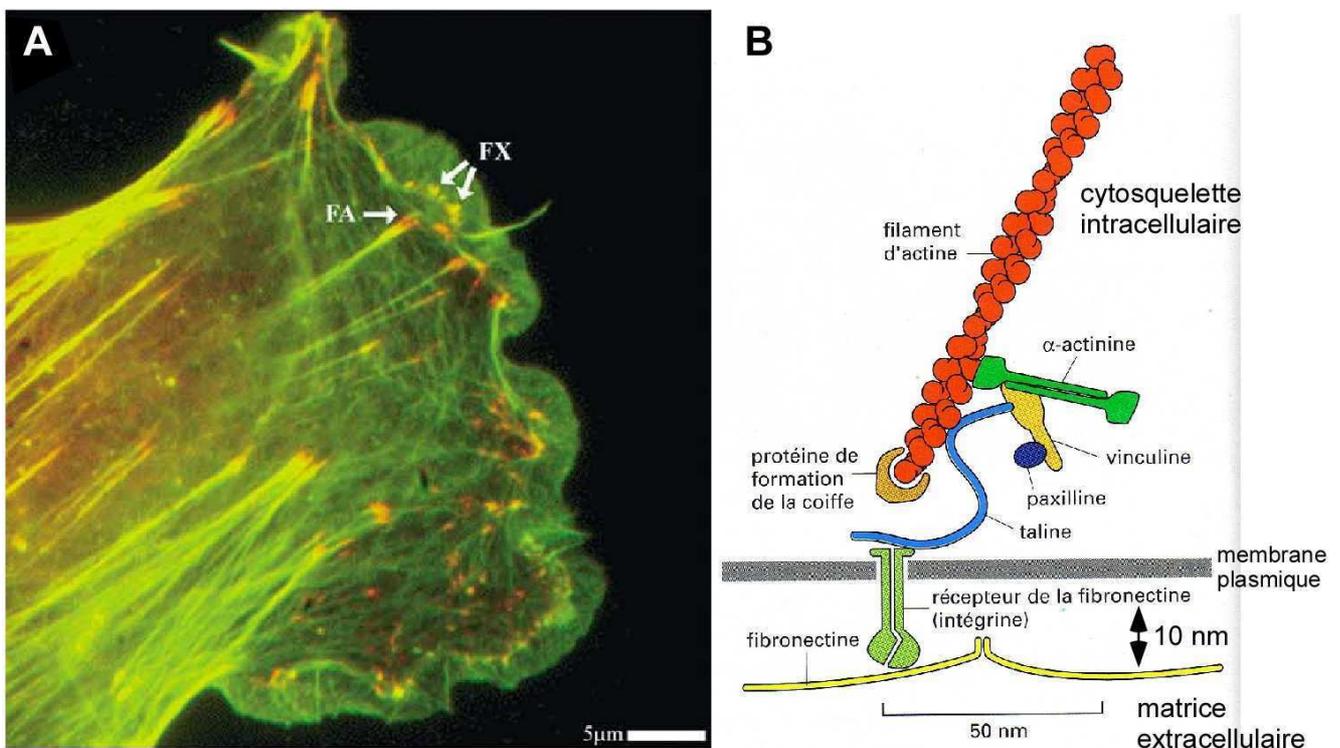


Figure 6_24: Sites d'ancrage au substrat des eucaryotes supérieurs.

A) Fibroblaste de souris. Immunomarquage de la vinculine (rouge) et marquage de l'actine avec de la phalloïdine (vert). Les fibres de tension ont leurs extrémités au niveau des adhésions focales riches en vinculine. FA: Adhésions Focales, FX: complexes focaux (tiré de Kaverina et al., 2002). **B)** Représentation schématique du lien, contenant des intégrines, entre la matrice extracellulaire, la membrane plasmique et le cytosquelette intracellulaire (adapté d'Alberts et al., 1994).

Dictyostelium possède des homologues de protéines appartenant aux contacts focaux et décrites chez les mammifères, comme la taline (Kreitmeier et al., 1995), l' α -actinine (Rivero et al., 1999) et aussi une protéine ayant certaines caractéristiques des intégrines et qui se lie à la taline (Cornillon et al., 2006). Des cellules *Dictyostelium* mutantes dépourvues de

taline présentent une adhérence à un substrat fortement réduite (Niewohner et al., 1997). SadA, identifiée comme protéine d'adhésion des cellules végétatives (Fey et al., 2002), possède neuf segments transmembranaires putatifs et trois domaines conservés semblables à des domaines EGF dans sa partie prédite comme extracellulaire. Ces domaines EGF sont similaires aux régions correspondantes dans d'autres protéines comme les intégrines.

Les structures d'adhésion rencontrées dans divers types cellulaires sont variées. Par exemple, les podosomes sont d'autres structures d'adhésion cellule-matrice qui attirent beaucoup d'attention ces dernières années (Linder and Kopp, 2005). Ces structures n'ont pas, à ce jour, été identifiées chez *Dictyostelium*.

6.6.3 Troisième et quatrième étapes dans la migration cellulaire : le détachement du substrat et la rétraction

Nous allons voir que les deux étapes de la migration, d'abord de détachement du substrat, ensuite de rétraction, dépendent grandement d'une même protéine, la myosine-II des cellules non musculaires, aussi appelée myosine-II cytoplasmique par opposition avec la myosine-II de muscles qui ne se trouve jamais sous forme soluble cytoplasmique. On utilise aussi parfois le terme de myosine conventionnelle, par opposition aux myosines non conventionnelles comme les myosines-I. Dans la suite, nous appellerons myosine-II cette protéine qui a été isolée et identifiée dans nombre de types cellulaires comme la levure et les cellules de mammifères. On pense qu'elle est présente dans toutes les cellules eucaryotes (Sellers and Goodson, 1995).

La myosine-II est un moteur moléculaire. C'est une enzyme qui hydrolyse l'ATP et utilise l'énergie chimique ainsi récupérée pour produire une force mécanique en se liant à des filaments d'actine.

6.6.3.1 Structure de la myosine-II

La myosine-II a une structure hexamérique similaire aux myosines des muscles lisse, cardiaque ou squelettique. Elle consiste en deux chaînes lourdes identiques (d'environ 220-240 kDa chacune) et deux paires de chaînes légères (d'environ 15-20 kDa pour chaque chaîne) (Clarke and Spudich, 1974). Chaque chaîne lourde peut être décrite comme l'association de deux domaines : une tête globulaire du côté N-terminal qui contient des sites de liaison à l'ATP, à l'actine et aux chaînes légères et une longue queue du côté C-terminal en

forme de longue hélice α . Les deux hélices α des deux chaînes lourdes s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une superhélice afin de former un dimère stable qui a deux têtes et une seule queue en forme de bâtonnet (Fig. 6_25_A). Chaque tête globulaire a à la fois une activité ATPase (dans les conditions physiologiques, 1 à 5 molécules d'ATP sont hydrolysées par seconde) et une activité motrice et se lie à deux chaînes légères différentes. Ces dernières sont appelées, pour des raisons historiques, chaîne légère essentielle (Essential Light Chain, ELC) et chaîne légère régulatrice (Regulatory Light Chain, RLC). La myosine peut être coupée par la trypsine en deux fragments partiellement fonctionnels, appelés méromyosine légère (light meromyosin, LMM) et méromyosine lourde (heavy meromyosin, HMM) (Fig. 6_25_B). Le fragment S1 de la méromyosine lourde, c'est-à-dire la tête globulaire, qui contient le site ATPasique, le site de liaison à l'actine et les sites de liaison aux chaînes légères, est suffisant pour assurer le rôle de moteur moléculaire mais ne peut pas former de filament (voir sa structure dans la Figure 6_25_C; Toyoshima et al., 1987). Au contraire, la longue queue du côté C-terminal ne peut pas jouer le rôle de moteur moléculaire, mais elle permet de former des filaments épais de myosine-II, le site de liaison entre deux myosines étant situé sur les queues des myosines (Pasternak et al., 1989; Fig. 6_25_D). Les filaments épais de myosine-II sont, par construction, bipolaires, alors que les filaments d'actine sont unipolaires (Bray, 1992 ; Stryer, 1995).

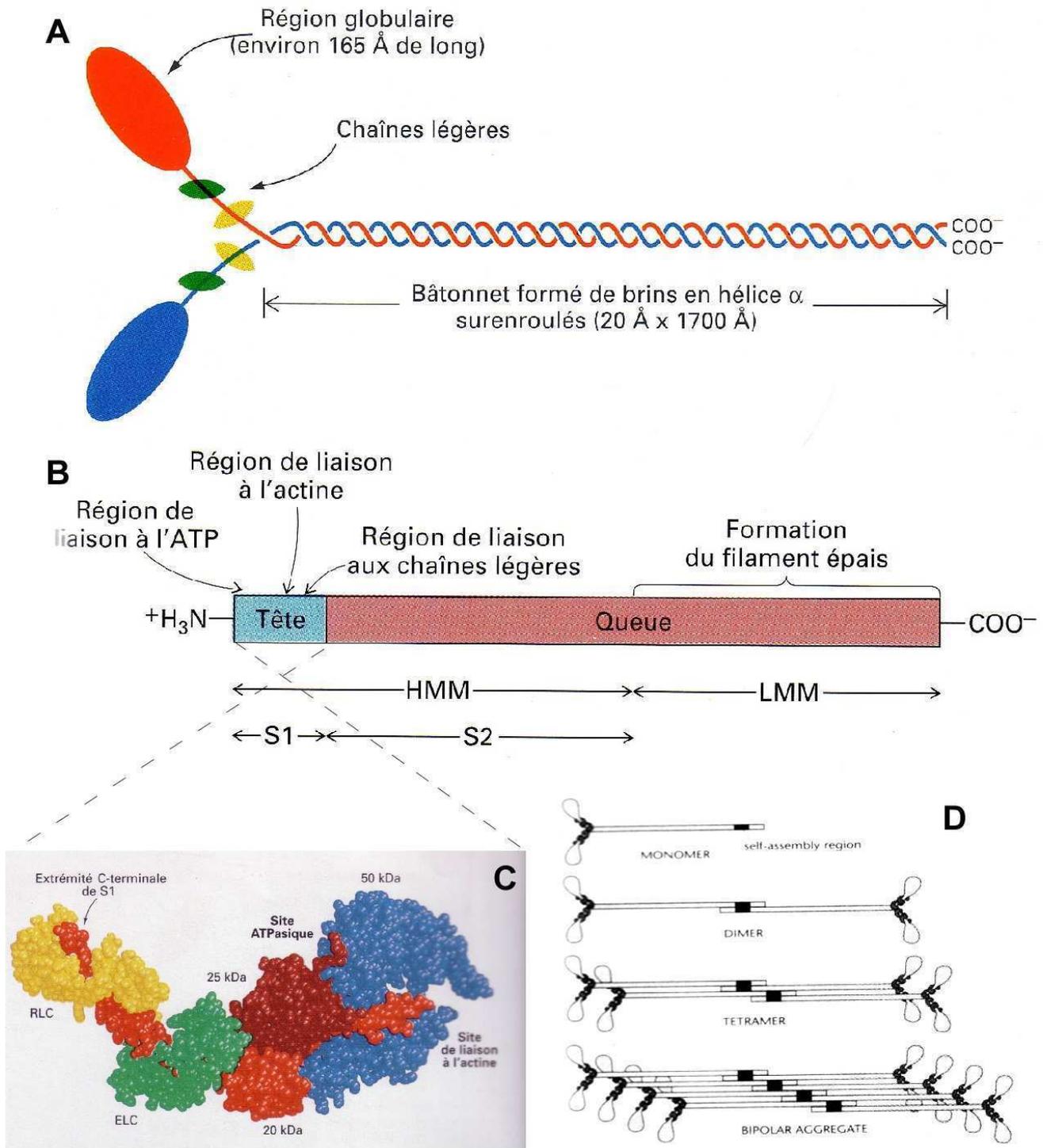


Figure 6_25: La myosine-II.

A) Représentation schématique de la myosine-II, avec ses deux chaînes lourdes et ses deux paires de chaînes légères.

B) La myosine-II peut être vue comme l'association de la méromyosine légère (LMM) et de la méromyosine lourde (HMM). Le fragment S1 est la tête globulaire et contient le site ATPasique, le site de liaison à l'actine et les sites de liaison aux chaînes légères.

C) Structure 3D de S1 déterminée par cristallographie de rayons X à 2.8 Angströms de résolution (A, B et C, tirés de Stryer, 1995).

D) L'assemblage des myosines-II en filaments épais bipolaires (d'environ 0.6-0.8µm). Le site de liaison entre deux myosines est situé sur les queues des myosines (tiré de Bray, 1992).

6.6.3.2 Production de forces par la myosine-II

L'interaction entre la tête d'une myosine-II et un filament d'actine adjacent va permettre le glissement de ce filament d'actine par rapport à la myosine grâce au coup de force (power stroke; Fig. 6_26 ; pour une revue, voir Spudich, 1994). L'analyse moléculaire de ce coup de force a permis de montrer que l'interaction probablement entre une seule molécule de myosine-II et un seul filament d'actine correspond à un déplacement de 5-20 nm et à la production de forces pouvant atteindre 7 pN (Finer et al., 1994 ; Ishijima et al., 1994). Pour pouvoir produire des forces contractiles, les molécules de myosine-II doivent préalablement s'assembler en un filament épais (de 0.6 - 0.8 μm) qui tire à chacune de ses extrémités sur deux filaments fins d'actine orientés têtes bêches (Fig. 6_27).

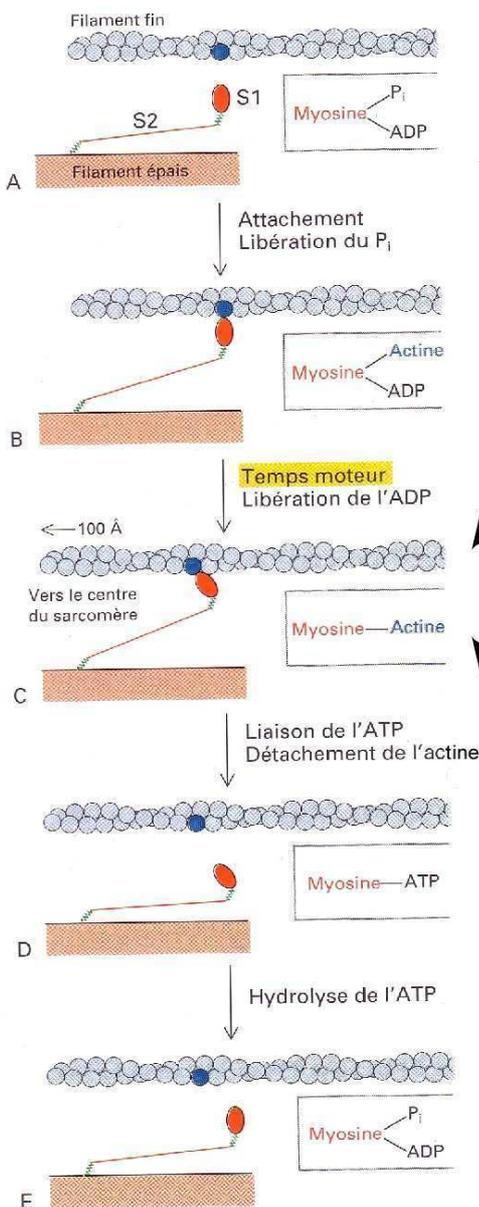


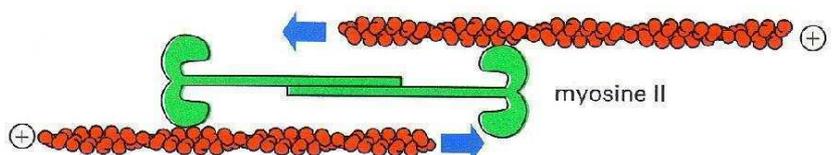
Figure 6_26: Coup de force.

Mécanisme hypothétique de la création d'une force par interaction d'une unité S1 d'un filament de myosine avec un filament d'actine. Lors du coup de force, le filament d'actine se déplace par rapport au filament épais d'environ 10 nm. La libération de l'ADP induit des changements conformationnels au niveau de S1, ce qui entraîne le coup de force. La génération de force par la myosine-II est possible grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Cette production de force (quelques pN) fonctionne de manière cyclique (tiré de Stryer, 1995).

position rigor

Figure 6_27 (ci-dessous): contraction due à la myosine-II.

En tirant sur deux filaments fins orientés têtes bêches, le filament épais de myosine-II génère une contraction du réseau d'actine (tiré d'Alberts et al., 1994).



6.6.3.3 Régulation de la myosine-II

Deux types de régulations à l'aide de kinases et de phosphatases interviennent, l'une, sur les chaînes légères et l'autre, sur les chaînes lourdes. En effet, la phosphorylation d'une des deux chaînes légères a deux effets *in vitro* : elle provoque un changement de conformation de la tête de myosine, mettant ainsi en évidence son site de liaison à l'actine, et elle libère la

Figure 6_28: Régulation de la myosine-II : phosphorylation des chaînes légères. La phosphorylation des chaînes légères est une condition nécessaire pour l'association en filaments épais. En effet, elle permet de libérer la queue de la myosine-II (tiré de Alberts et al., 1994).

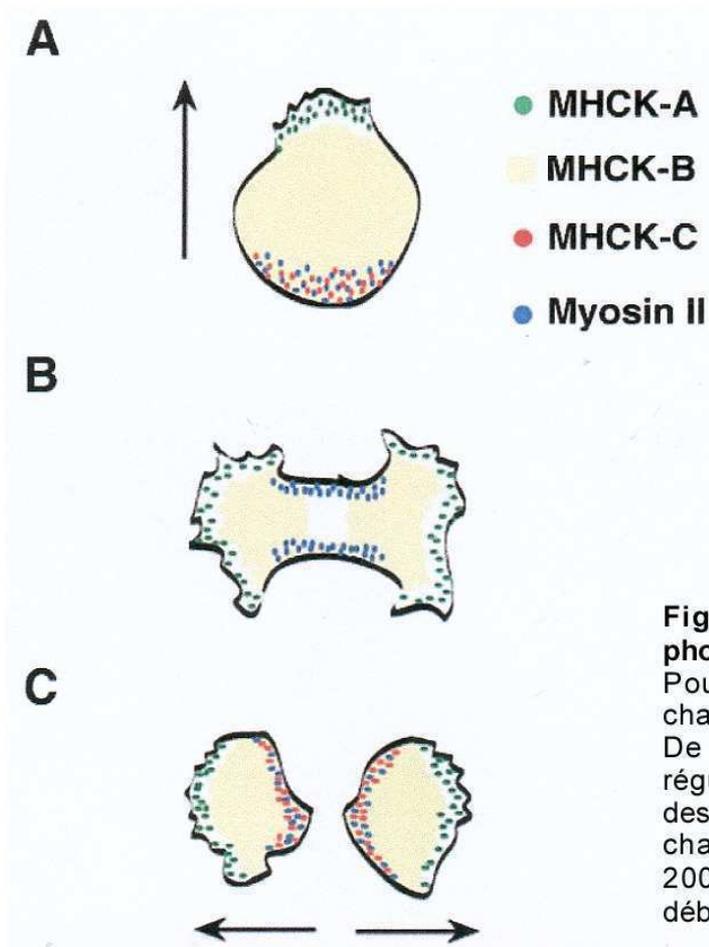
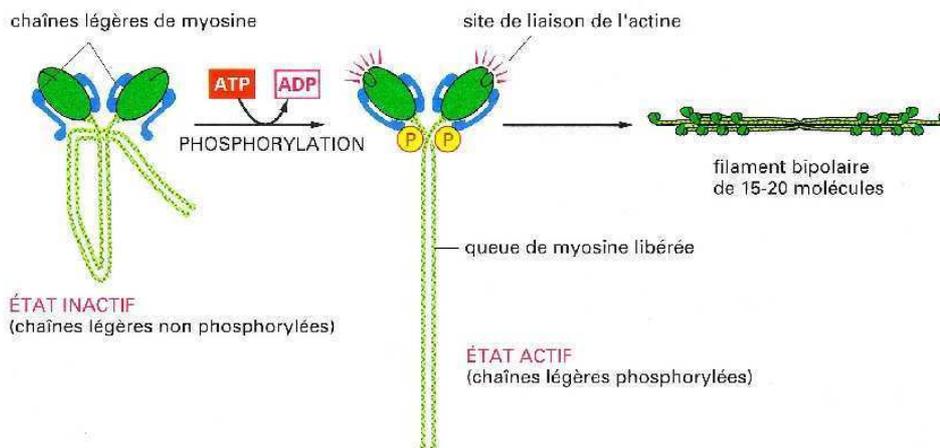


Figure 6_29: Régulation de la myosine-II : phosphorylation des chaînes lourdes.

Pour pouvoir former des filaments épais, les chaînes lourdes doivent être déphosphorylées. De nombreuses kinases des chaînes lourdes régulent l'assemblage en filaments épais avec des localisations intracellulaires différentes pour chacune de ces kinases (tiré de Liang et al., 2002). **A)** Cellule en migration. **B)** Cellule en début de division. **C)** Cellules après la division.

queue de myosine-II, auparavant repliée, donnant ainsi la possibilité aux molécules de myosine-II de s'assembler en filaments épais bipolaires (Fig. 6_28). L'enzyme responsable de cette phosphorylation est appelée la kinase de la chaîne légère de myosine (Myosin Light Chain Kinase ou MLCK) (Alberts et al., 1994). Au contraire, la phosphorylation des chaînes lourdes entraîne le désassemblage des filaments épais de myosine-II. La déphosphorylation de ces chaînes est une condition nécessaire à la formation des filaments. En particulier, chez *Dictyostelium*, au moins quatre types de kinases phosphorylent les chaînes lourdes : la MHCK-A, la MHCK-B et la MHCK-C et la MHCK-D et ces quatre kinases ont des rôles distincts (Fig. 6_29 ; De La Roche et al., 2002; Liang et al., 2002):

- la MHCK-A joue un rôle dans la relaxation des pôles et le désassemblage des filaments au niveau des pôles lors de la division cellulaire
- la MHCK-B est présente dans le cytosol et contribue au turnover continu et uniforme des filaments de myosine-II
- la MHCK-C facilite l'enlèvement de la myosine-II dans l'anneau de contraction d'une cellule en division et à l'arrière d'une cellule en migration
- la MHCK-D dont le rôle n'a pas encore été clairement établi.

La présence de quatre MHCKs souligne l'importance de la régulation de l'assemblage des filaments de myosine-II pour des cellules comme *D. discoideum* qui migrent rapidement.

Un autre type de régulation par les ions calcium a été mise en évidence par Yumura (1993). Son étude a montré, à l'aide d'ionophores pour le calcium, que l'assemblage de filaments de myosine-II chez *Dictyostelium* était déclenché par le calcium. Une autre étude avec des cellules ne présentant pas d'entrée de calcium après stimulation par l'AMPc a indiqué une translocation et un assemblage tout à fait normaux de GFP-myosine-II (Levi et al., 2002). Ces deux travaux suggèrent donc l'existence d'au moins deux voies indépendantes de régulation de l'assemblage des filaments de myosine-II, l'une dépendant du calcium et l'autre pas.

6.6.3.4 Fonctions de la myosine-II dans différents processus biologiques. Rôle dans la migration cellulaire

Différentes techniques ont permis d'énormes avancées dans la compréhension du rôle de la myosine-II dans divers organismes. En particulier, la technique de fusion de protéines fluorescentes comme la GFP a permis de localiser les filaments épais de myosine-II (Moore et al., 1996). Les manipulations génétiques permettant de fabriquer des mutants null pour la myosine-II ou de muter certains sites de la protéine ont aussi apporté d'importants résultats

quant aux fonctions jouées par la myosine-II et, en particulier, par certains sites spécifiques (Knecht and Loomis, 1987; De Lozanne and Spudich, 1987; Ruppel et al., 1994). Une troisième classe d'expériences utilisant des systèmes reconstitués à l'aide de protéines purifiées a aussi permis de comprendre le fonctionnement moléculaire des filaments de myosine-II (Kron and Spudich, 1986). Enfin, la biologie structurale a apporté de précieuses informations quant à la structure tri-dimensionnelle de la protéine permettant de suggérer des modèles de fonctionnement (pour des revues, voir : Ruppel and Spudich, 1995; Ruppel et al., 1995).

Chez *Dictyostelium*, on dénombre un seul gène codant pour la chaîne lourde de la myosine-II. Ce gène a été cloné en 1985 (De Lozanne et al., 1985) et séquencé en 1986 (Warrick et al., 1986). Les mutants myo-II-null sont apparus dès 1987 (Knecht and Loomis, 1987; De Lozanne and Spudich, 1987; Manstein et al., 1989; Ruppel et al., 1994) et toute une série de mutations de sites spécifiques de la protéine ont aussi permis de disséquer le fonctionnement moléculaire du moteur (Ruppel et al., 1994). La fusion GFP-myo-II a été utilisée dans cette amibe dès 1996 (Moores et al., 1996). A peu près au même moment, de nombreuses expériences in vitro à l'aide de protéines purifiées d'actine et de myosine-II ont permis de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire de ce moteur ainsi que son mode de liaison à l'actine dans la génération du coup de force (Fig. 6_30 ; Spudich et al., 1985; Kron and Spudich, 1986; Toyoshima et al., 1989; Uyeda et al., 1990; Uyeda et al., 1991). Le rôle de la myosine-II chez *Dictyostelium* est donc déjà très amplement documenté.

Des études utilisant le marquage par immunofluorescence ont indiqué que la myosine-II était localisée au niveau de l'anneau de constriction (dans le sillon de division) d'une cellule en division et à l'arrière d'une cellule en migration. Ces travaux ont suggéré que la myosine-II permettait la production de forces de contraction lors de la division cellulaire, de la migration cellulaire, et de la contraction du corps cellulaire en réaction à une stimulation uniforme par l'AMPc (Yumura et al., 1984; Fukui, 1990; Yumura, 1993).

Ensuite des souches mutantes de cellules *D. discoideum* myo-II-null ont été réalisées (Knecht and Loomis, 1987; De Lozanne and Spudich, 1987; Manstein et al., 1989). Ces cellules sont viables et peuvent migrer mais moins efficacement. Elles forment des agrégats multicellulaires anormaux ne donnant pas de corps fructifère. De plus, elles ont un défaut lors de la division cellulaire, et ne peuvent se diviser que sur substrat solide. En effet, elles meurent en culture agitée, et ne peuvent modifier leur forme tri-dimensionnelle sans adhérer à un substrat (Shelden and Knecht, 1996). Même sur substrat solide, ce défaut dans la division entraîne la formation de cellules polynuclées particulièrement grosses.

L'utilisation de ces souches myo-II-null a aussi permis de montrer chez *Dictyostelium* que ces cellules étaient environ trois fois plus lentes, plus rondes, et moins bien polarisées dans un gradient de cAMP (Wessels et al., 1988). La taille des pseudopodes ainsi que leur vitesse de croissance est environ la moitié de celles de la souche parentale, ce qui suggère un rôle important de la myosine-II dans la formation des protrusions. De plus, il a été soutenu que la myosine-II était nécessaire pour la formation de coiffes (capping) de protéines membranaires réticulées par une lectine tétravalente (la concanavaleine A) (Pasternak et al., 1989). Ce même article rapporte que la myo-II génère en partie la tension corticale du cytosquelette d'actine. Plus tard, Aguado-Velasco and Bretscher (1997) ont montré que les cellules myo-II-null pouvaient toujours former des coiffes de protéines membranaires réticulées par la ConA mais moins efficacement que les cellules « sauvages ». Le transport vers le bord arrière de la cellule et la formation de clusters de billes recouvertes de concanavaleine A ne nécessite pas de myosine-II mais un cytosquelette d'actine intact (Jay and Elson, 1992). Ces études qui montrent que les cellules myo-II-null sont toujours capables de « capping », de générer un mouvement de particules en surface et de migrer, réhabilitent donc l'idée qu'une relation mécanistique entre la capacité à coiffer des protéines membranaires (liée au transport de particules en surface) et la capacité de migrer n'est pas exclue.

Des études sur différents substrats ont montré que la myosine-II participait au détachement du substrat et à la rétraction de l'arrière de la cellule (Jay et al., 1995). D'autres travaux ont cherché à comprendre quel était le problème de développement des cellules myo-II-null (Elliott et al., 1993). Une possibilité est que le cortex de ces cellules est trop mou pour résister aux forces produites dans les courants d'agrégation. Les mutants myo-II-null sont en effet incapables de pénétrer dans un corps multicellulaire formés par des cellules sauvages (Shelden and Knecht, 1995).

La possibilité de facilement manipuler génétiquement cette amibe a permis de tester les effets de mutations d'un acide aminé particulier ou d'un domaine particulier d'une protéine. Ainsi la lysine 130 de la myosine-II est impliquée dans l'interaction entre la tête de la myosine et l'ATP (Ruppel et al., 1994). Un autre acide aminé (l'arginine 1880) de la queue de la protéine est indispensable pour la formation de filaments épais (Moore and Spudich, 1998). Un domaine de la queue de la chaîne lourde est nécessaire pour le désassemblage des filaments *in vivo* (Egelhoff et al., 1991). La chaîne légère régulatrice joue un rôle dans la division cellulaire et le développement (Chen et al., 1994).

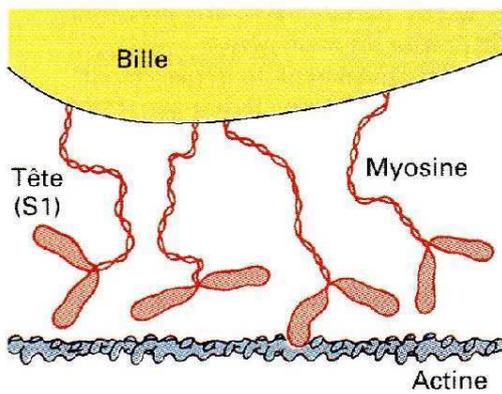


Figure 6_30: Système in vitro.
Des molécules sont attachées à des billes qui se déplacent dans une seule direction, le long des filaments d'actine lorsque l'ATP est hydrolysé (tiré de Stryer, 1995).

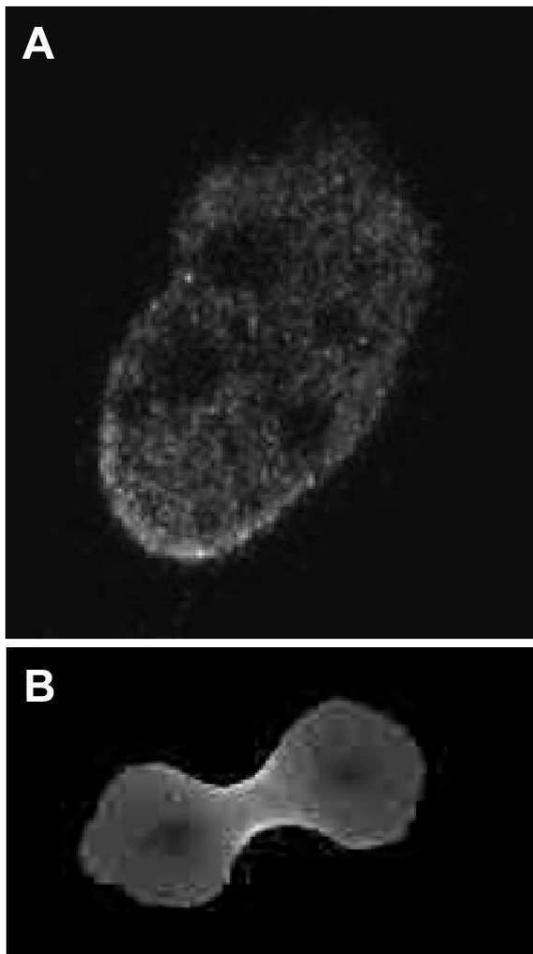


Figure 6_31: La GFP-myosine-II est un outils précieux pour suivre la distribution intracellulaire de ce moteur moléculaire. **A)** Cellule *Dictyostelium* en migration dont l'arrière en rétraction est marqué par la GFP-myosine-II. **B)** Cellule en division: la GFP-myosine-II s'accumule au sillon de division (tiré de Robinson et al., 2002).

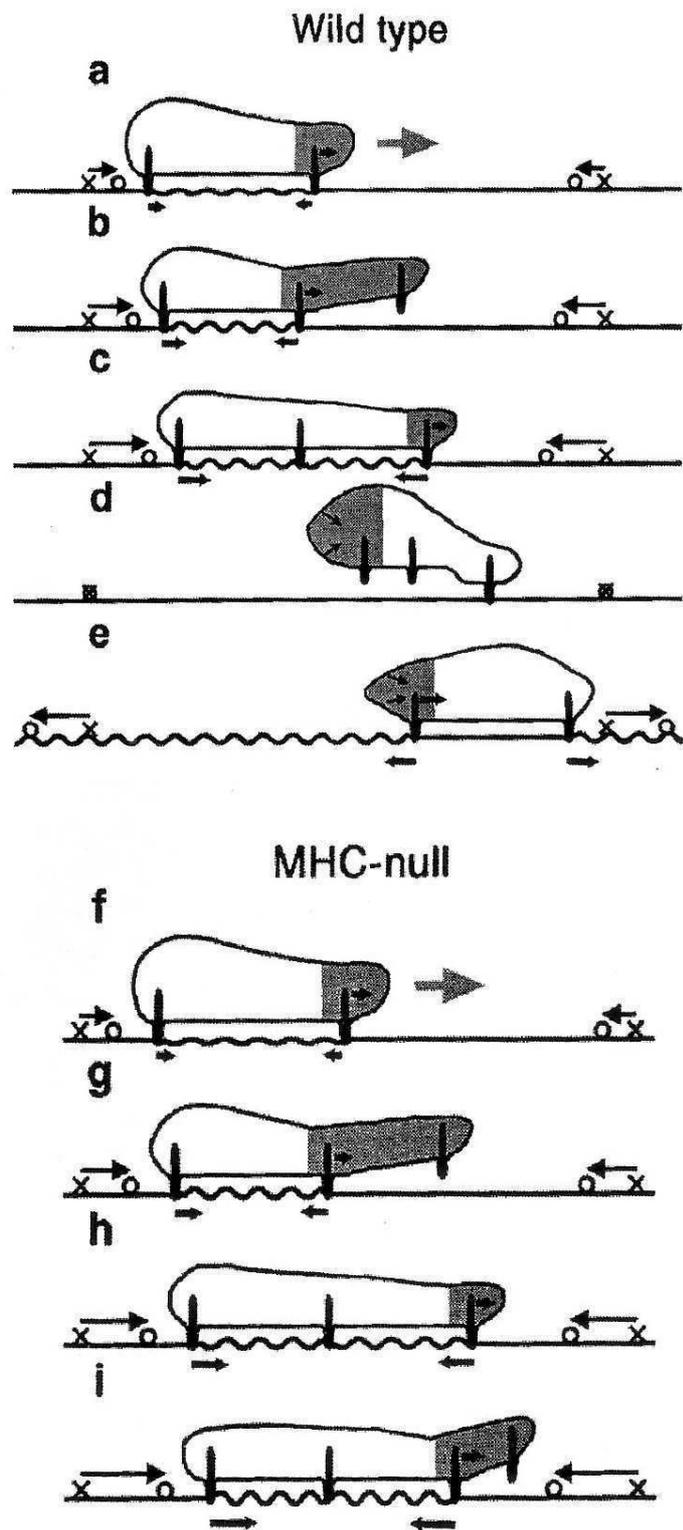


Figure 6_32: La myosine-II participe à la rétraction lors de la migration cellulaire.
Au contraire de cellules sauvages qui rétractent efficacement, les cellules myo-II-null montrent une rétraction déficiente (tiré de Uchida et al., 2003).

Grâce à la découverte de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) et aux possibilités de fusion avec d'autres protéines d'intérêt, il est devenu possible de suivre la distribution intracellulaire de protéines de fusion. Ainsi, en transformant des cellules myo-II-null avec un plasmide codant pour la GFP-myosine-II, le phénotype sauvage a été restauré et la dynamique en temps réel de redistribution de cette protéine a pu être observée (Moore et al., 1996). Ces observations ont confirmé la localisation de la myosine-II dans les régions en contraction (sillon de division et arrière par exemple) et ont aussi permis une analyse plus fine de cette redistribution (Fig. 6_31 ; Robinson et al., 2002). Par ailleurs, il est à noter que, dans des cellules sauvages, la myosine-II n'est pas dans toutes les conditions expérimentales particulièrement concentrée en anneau au sillon de division (Neujahr et al., 1997). Ceci est en accord avec le fait que la division cellulaire peut se dérouler quasi normalement sans myosine-II dans des conditions favorables (attachement à un substrat solide). Dans des conditions défavorables, comme en culture agitée, les cellules myo-II-null ne peuvent pas se diviser, probablement car elles ne peuvent pas modifier leur forme sans être en contact avec un substrat (Shelden and Knecht, 1996). Dans d'autres conditions défavorables comme en compression sous une couche de gel d'agar, la division est retardée dans les cellules sauvages et se fait très difficilement sans myosine-II (Neujahr et al., 1997). Par ailleurs, sous stress hyper osmotique, la myosine-II est recrutée dans le cortex qui forme une coquille rigide autour des cellules (Kuwayama et al., 1996). L'idée qui ressort de ces observations est que sous des forces extérieures (pression osmotique, compression sous gel d'agar, ...), la cellule contracte globalement plus (peut-être par un processus d'inhibition du désassemblage des filaments épais) et utilise plus la myosine-II en réaction aux forces extérieures d'où son accumulation marquée en filaments épais au sillon de division, ou à l'arrière, ou sous forme de coquille autour de la cellule. Les cellules sauvages sur substrat solide recouvert de liquide, elles, ne sont pas stressées et n'ont pas particulièrement besoin de recourir à la myosine-II sous forme d'anneau contractile pour se diviser (Neujahr et al., 1997).

Des travaux plus récents confirment que la myosine-II joue un rôle important dans la rétraction de l'arrière (Fig. 6_32 ; Uchida et al., 2003), contribue à rigidifier le cortex d'actine en tant que protéine de réticulation (Laevsky and Knecht, 2003), et limite la formation de protrusions sur les côtés favorisant ainsi la directionnalité du mouvement (Parent, 2004; Postma et al., 2004). Néanmoins d'autres études théoriques et expérimentales apportent le doute en soutenant au contraire que la myosine-II fluidifierait le cytosquelette d'actine et le rendrait plus mou et moins résistant aux déformations (Humphrey et al., 2002; Keller et al., 2003). Dans ces études, il est suggéré que la myosine-II est une protéine de réticulation très

dynamique qui permet un réarrangement du cytosquelette très rapide contrairement à d'autres protéines de réticulation qui s'associent et se dissocient plus lentement avec l'actine et donc rendent le cytosquelette d'actine plus rigide dans les cellules myo-II-null. D'autres travaux sont nécessaires pour trancher sur ce sujet.

6.6.4 Les microtubules dans la migration cellulaire

Pendant l'interphase, les microtubules de *Dictyostelium* forment un réseau cytoplasmique de filaments creux qui rayonnent du centrosome (centre organisateur des microtubules) à partir duquel ils croissent en polymérisant des unités de dimères de tubuline (α et β). Ils s'étendent vers le cortex périphérique, longent souvent le cortex et peuvent être courbés à leur extrémité de telle manière que cette dernière revient vers le centre de la cellule (Fig. 6_33 ; Koonce and Khodjakov, 2002). Comme les filaments d'actine, les microtubules sont orientés avec une extrémité qui croît rapidement (notée +) et une extrémité (notée -) stabilisée par le centrosome. Ils se dépolymérisent et se repolymérisent continuellement et sont des structures dynamiques et très motiles (Alberts et al., 1994). A partir d'observations en microscopie électronique et de fluorescence, on estime entre 30 et 70 le nombre de microtubules par centrosome chez *Dictyostelium* (Moens, 1976; Kuriyama et al., 1982; Kimble et al., 2000). Il a été montré que les microtubules jouaient un rôle important dans divers processus biologiques comme le trafic d'organites à l'intérieur de la cellule (Clarke et al., 2002) ou la division cellulaire (McIntosh et al., 1985; Neujahr et al., 1998). En particulier, les moteurs moléculaires liés aux microtubules ont beaucoup été étudiés et ces études ont démontré que la kinésine et la dynéine dirigent le mouvement des organites le long des microtubules qui jouent alors le rôle de rails (Fig. 6_34 ; Alberts et al., 1994).

La dynéine, qui se déplace vers l'extrémité moins des microtubules, a été identifiée chez *Dictyostelium* (Koonce and McIntosh, 1990) et est principalement localisée au cortex (Koonce and Khodjakov, 2002). Il a été prouvé qu'elle jouait un rôle dans les interactions microtubules-cortex (Koonce and Samso, 1996; Koonce et al., 1999). Des protéines associées à la dynéine (Hestermann et al., 2002), comme la dynactine (Ma et al., 1999), sont aussi localisées au cortex. Ces données avec des observations microscopiques indiquant un positionnement du centrosome en relation avec les mouvements de MTs près et le long du cortex (Fig. 6_35_A ; Neujahr et al., 1998; Koonce and Khodjakov, 2002; Hestermann et al., 2002) ont permis l'élaboration d'un modèle, généralement accepté, selon lequel les microtubules s'étendent du centre organisateur vers la périphérie où ils font des contacts

dynamiques avec le cortex dépendant de la dynéine et de la dynactine (Fig. 6_35_B). Ainsi, la dynéine corticale (par opposition à la dynéine cytoplasmique) fournit une force de traction qui détermine le positionnement du centrosome et garde les microtubules sous forme de réseau étiré.

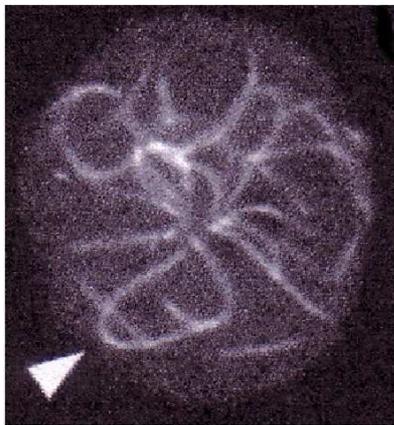


Figure 6_33 (gauche): Cellule *Dictyostelium discoideum* marquée à la GFP- α -tubuline. Le réseau de microtubules s'étend du centrosome en forme d'étoile. Les microtubules sont courbés à leur extrémité de sorte que celle-ci revient vers le centre de la cellule (pointeur) (tiré de Koonce and Khodjakov, 2002).

Figure 6_34 (dessous): Les microtubules servent de rails à des moteurs moléculaires. (A) Les kinésines et les dynéines cytoplasmiques sont des protéines qui se déplacent généralement dans des directions opposées le long d'un microtubule. Ces protéines sont des complexes composés de deux chaînes lourdes identiques et de plusieurs chaînes légères plus petites. Chaque chaîne lourde forme une région de tête globulaire qui attache la protéine aux microtubules d'une façon dépendante de l'ATP. (B et C) Micrographies électroniques d'une molécule de kinésine (B) et de dynéine cytoplasmique (C). Tiré de Alberts et al., 1994.

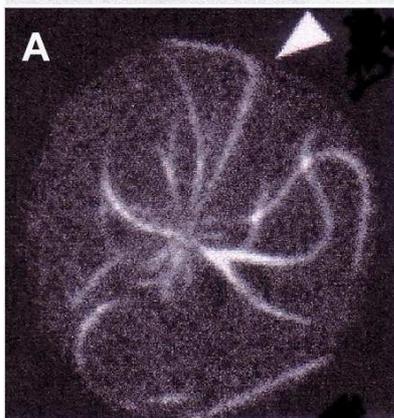
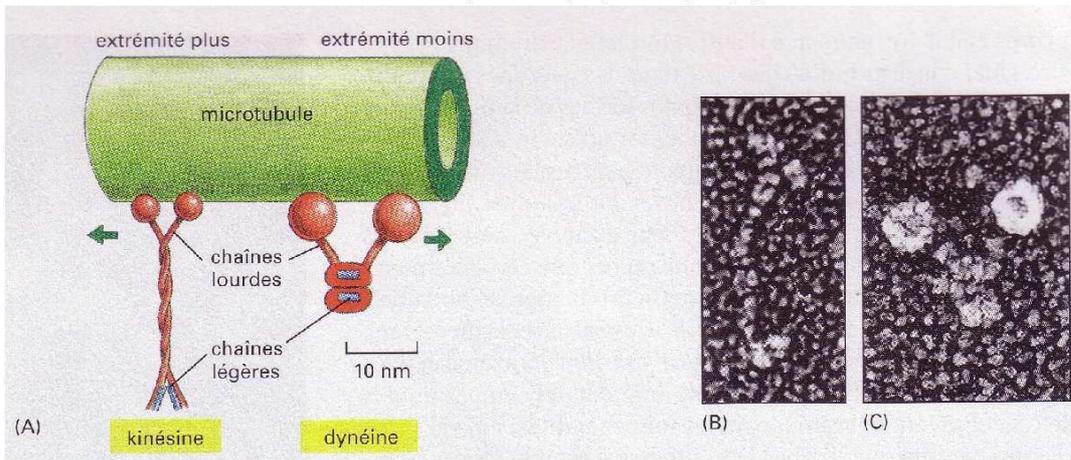
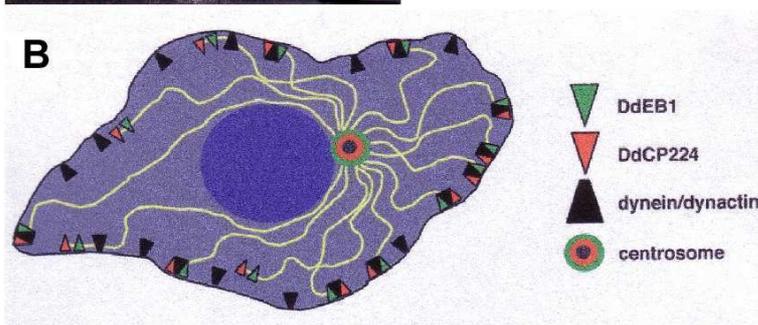


Figure 6_35: Les microtubules forment des points d'attache avec le cortex.

A (gauche) Le coude indiqué par le pointeur est un point de production de force du cortex sur le microtubule. Après ce coude, le microtubule longe le cortex (tiré de Koonce and Khodjakov, 2002).

B (dessous) Dessin schématique d'une cellule *Dictyostelium discoideum*. Les extrémités + des microtubules font des contacts dynamiques avec le cortex. En particulier, on trouve dans ces complexes protéiques de liaison la dynéine corticale et la dynactine (tiré de Hestermann et al., 2002).



Récemment, de nouvelles études ont apporté un nouvel éclairage et ont montré que les microtubules remplissaient des fonctions importantes lors de la migration cellulaire justement grâce aux interactions de ces derniers avec le cortex et la participation de nombreuses protéines de régulation.

Chez *Dictyostelium* et d'autres amibes, le centrosome ne détermine pas la direction de migration mais stabilise un pseudopode en se repositionnant dans la direction de la protrusion. En effet, si le centrosome ne suit pas l'émission de la protrusion dans les 30 secondes, alors celle-ci est rétractée (Ueda et al., 1997; Ueda and Ogihara, 1994). Les microtubules peuvent donc être considérés comme des capteurs des changements de direction qui aident à maintenir en permanence le centrosome en position centrale de la cellule. De cette manière, les microtubules jouent un rôle dans la directionnalité du mouvement cellulaire.

Dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les microtubules interagissent avec les zones d'adhésion au substrat et facilitent leur dissolution ou leur détachement en interagissant avec le cytosquelette d'actine (Etienne-Manneville, 2004). Ces mécanismes nécessitent la participation de nombreuses protéines qui se lient aux extrémités + des microtubules (Small and Kaverina, 2003) et confèrent aux microtubules un rôle dans l'établissement de la polarité cellulaire.

6.7 Chimiotactisme, voies de signalisation. Détection d'un gradient chimique, polarisation et orientation cellulaires

Dictyostelium discoideum a beaucoup été utilisé pour étudier le chimiotactisme afin de découvrir et comprendre les voies de signalisation menant à la polarisation et à l'orientation cellulaires dans un gradient de chimioattractant (pour des revues, voir Parent and Devreotes, 1999; Chung et al., 2001; Comer and Parent, 2002; Devreotes and Janetopoulos, 2003; Kimmel and Parent, 2003).

Dictyostelium possède des récepteurs à l'AMPC qui sont couplés aux protéines G hétérotrimériques. Ces récepteurs, de même que les protéines G, sont uniformément répartis sur la membrane plasmique. Ce sont des récepteurs d'hormones à 7 segments (hélices) transmembranaires. Lorsqu'ils sont activés par la liaison de molécules d'AMPC, les protéines G hétérotrimériques (constituées de trois unités α , β et γ) sont à leur tour activées et se dissocient en sous-unités $G_{\beta\gamma}$ et G_{α} . Cette activation a lieu à l'avant de cellules qui chemotent (Parent et al., 1998). L'ensemble $G_{\beta\gamma}$ active alors toute une série de protéines

telles la phosphoinositide 3-kinase, PI3K³ (une kinase qui phosphoryle le lipide PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ et le PI(4)P en PI(3,4)P₂), l'adenylyl cyclase (AC) (qui transforme une molécule d'ATP en une molécule d'AMPc qui jouera un rôle de second messenger intracellulaire et extracellulaire), la guanylyl cyclase (GC) (qui transforme une molécule de GTP en une molécule de GMPc qui jouera aussi un rôle de second messenger intracellulaire) et la protéine Ras, une protéine de la famille des petites RhoGTPases, qui active aussi la PI3K (Fig. 6_36). La protéine Ras est un régulateur amont essentiel pour l'activation de la PI3K en réponse à l'AMPc (Funamoto et al., 2002). Elle est nécessaire pour l'activation de la PI3K mais pas pour sa localisation à la membrane, prouvant l'existence de deux voies amont indépendantes, une pour la localisation à la membrane de la PI3K, l'autre pour son activation. La localisation et l'activation de la PI3K au niveau de la membrane plasmique dirige la formation de nouvelles protrusions et le mouvement cellulaire. Il est à noter que le PI(3,4,5)P₃, lipide membranaire et produit de la PI3K, a une position privilégiée dans la cellule : c'est la molécule la plus amont des voies de signalisation connue pour montrer une asymétrie pendant le chimiotactisme et qui est suffisamment en aval pour induire la polarisation et la motilité. Ainsi, du côté de la cellule activé par l'AMPc va s'accumuler du PI(3,4,5)P₃, qui a la particularité de se lier à et de recruter des protéines qui contiennent un domaine PH (pleckstrin homology). Parmi ces protéines, on trouve la PhdA, Akt/PKB, CRAC qui vont donc se lier à la membrane, en quantité, du côté stimulé par l'AMPc. Ces protéines contenant un domaine PH activent la polymérisation de l'actine.

Au contraire des activations vues plus haut, G_{βγ} inhibe la phosphatase PTEN du côté avant de la cellule (PTEN détruit les produits de la PI3K et inhibe donc les voies PI3K-dépendantes, voir Figure 6_37). La localisation de PTEN (aux côtés latéraux et postérieur d'une cellule qui chemotaxe) est l'opposé de la localisation de la PI3K (Funamoto et al., 2002). A l'arrière, on pense que PAKa inhibe la kinase A de la chaîne lourde de la myosine-II (la MHCKA), ce qui stimule l'assemblage de la myo-II (Chung and Firtel, 1999). Une cascade de signalisation impliquant le GMPc joue un rôle majeur dans la régulation de la myosine-II via l'activation de GbpC, une protéine qui contient des domaines homologues à Ras (Bosgraaf et al., 2002). Cette cascade conduit à l'assemblage de la myosine-II en filaments épais et donc la contraction du côté opposé au côté stimulé par l'AMPc.

³ En fait, *Dictyostelium* possède 3 PI3Ks de classe 1 que sont la PI3K1, PI3K2 et PI3K3. Ces PI3Ks contiennent toutes des domaines qui se lient à la protéine Ras (domaines RBDs pour Ras Binding Domains). La PI3K2 joue un rôle plus important que la PI3K1 dans les voies de signalisation utilisant une PI3K à la suite d'une activation par l'AMPc. Cependant, la PI3K1 et la PI3K2 agissent probablement de manière synergique dans les réponses dépendant de la PI3K et sont toutes les deux localisées à l'avant protrusif de la cellule.

L'ensemble de ces voies de signalisation entraînent donc l'apparition de deux côtés de la cellule bien distincts : un côté où est activée la polymérisation de l'actine et un côté où est activée la contraction due à la formation de filaments de myo-II. La cellule est donc polarisée avec un côté qui protubère et un côté qui rétracte et elle est orientée par rapport à la source d'AMPC, les protrusions étant dirigées vers les hautes concentrations d'AMPC (Fig. 6_38).

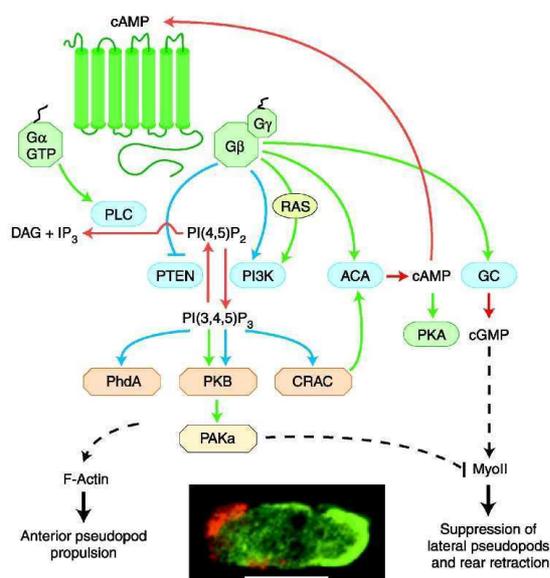


Figure 6_36 (ci-dessus): Voies de signalisation menant à la régulation spatiale et temporelle de la réponse chimiotactique de *D. discoideum* dans un gradient d'AMPC (tiré de Kimmel and Parent, 2003).

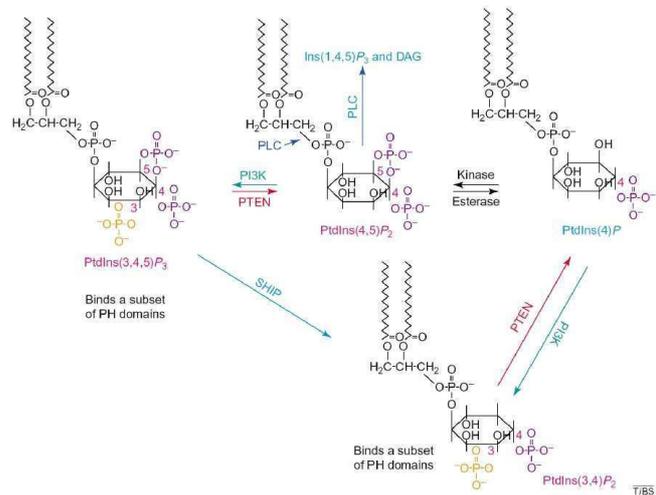


Figure 6_37 (ci-dessus): actions antagonistes de la kinase PI3K et de la phosphatase PTEN. Les deux phosphoinositides PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ peuvent servir de sites de liaisons pour de nombreuses protéines contenant des domaines PH, comme Akt/PKB, CRAC, PhdA. Certaines de ces protéines se lient préférentiellement au PI(3,4)P₂ ou au PI(3,4,5)P₃. La protéine SHIP est donc un point de régulation et peut faire une sélection entre les voies de signalisation dépendant de la PI3K, en jouant sur les niveaux de PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃. Le substrat principal de la PI3K, le PI(3,4)P₂, est aussi un substrat pour la phospholipase C (tiré de Chung et al., 2001).

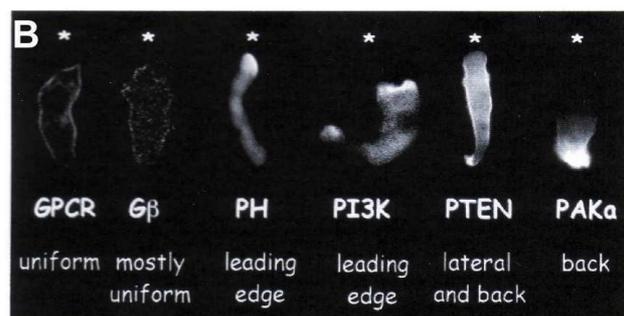
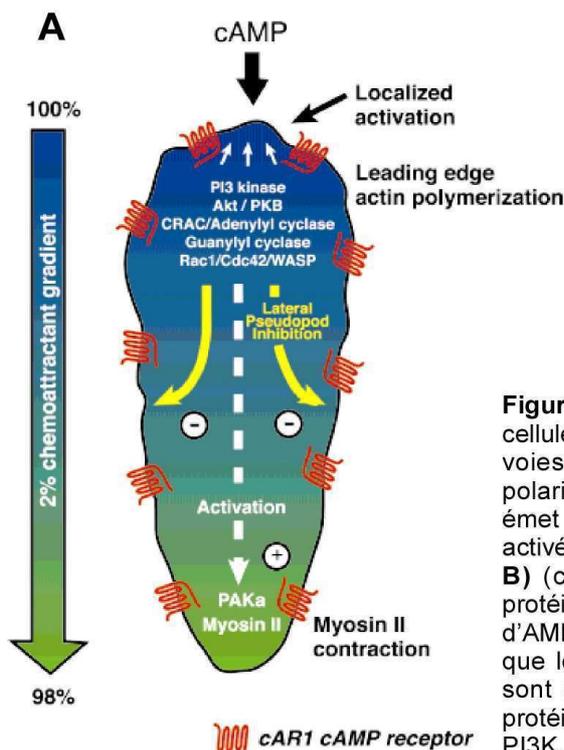


Figure 6_38: En réponse à la présence d'un gradient d'AMPC, les cellules sont polarisées. **A** (gauche) L'activation de nombreuses voies de signalisation par l'AMPC provoque l'apparition d'une polarité cellulaire: en amont du gradient d'AMPC, le front avant émet des protrusions riches en actine. A l'arrière, la myosine-II est activée et provoque la rétraction (tiré de Firtel and Chung, 2000). **B** (ci-dessus) Exemples de la localisation de différentes protéines dans une cellule *Dictyostelium* répondant à un gradient d'AMPC (l'astérisque représente l'extrémité de la micropipette). Alors que les récepteurs couplés aux protéines G et les protéines G sont uniformément réparties tout autour de la cellule, d'autres protéines comme des protéines contenant des domaines PH, la PI3K, PTEN et PAKα montrent une distribution asymétrique entre le front avant et le front arrière (tiré de Comer and Parent, 2002).

L'amibe *Dictyostelium discoideum* peut détecter un gradient d'AMPC très faible, avec des différences de concentrations aussi faibles que 2% entre les fronts avant et arrière de la cellule. Il existe donc un mécanisme d'amplification qui permet à la cellule de créer un gradient intracellulaire beaucoup plus élevé que le gradient de chimioattractants extracellulaire qu'elle détecte. Ces mécanismes d'amplification sont souvent associés à des boucles de feedback positif ou négatif entre plusieurs protéines (Weiner, 2002). Par exemple, dans les neutrophiles, les protéines de la famille des RhoGTPases contrôlent des aspects fondamentaux du chimiotactisme. Rac se trouve à l'avant et participe à une boucle de feedback positif avec la PI3K et la F-actine. A l'arrière, Rho et ROCK (PAKa chez *Dictyostelium*) activent l'assemblage de la myosine-II. Des boucles de régulation négative font intervenir des RhoGTPases et des GEFs (facteur d'échange GDP/GTP, Guanine nucleotide Exchange Factor) de ces RhoGTPases. De plus, ces deux voies qui font chacune intervenir une petite GTPase (Rac et Rho) s'inhibent mutuellement ce qui renforce leur séparation spatiale et amplifie le gradient chimique intracellulaire (Fig 6_39 ; Meili and Firtel, 2003; Li et al., 2003; Xu et al., 2003). Des modèles de « self-organization » ou de « self-organizing pattern formation » sont proposés. Ces modèles théoriques consistent en des boucles de feedback positif à courte portée pour permettre l'auto-amplification du signal et des boucles de feedback négatif à longue portée qui permettent l'inhibition de voies de signalisation à partir de ce même signal. En accord avec une auto-amplification du signal à l'avant, Postma et al. (2004) ont proposé que des patchs matures de PIP3 étaient formés en s'auto-amplifiant à partir du moment où un minimum de PIP3 étaient synthétisés en réponse à de très faibles concentrations d'AMPC. Les propriétés des patchs ne dépendent pas du stimulus chimique, seulement leur probabilité d'apparition dépend du signal. L'avantage de ce genre de structures qui s'auto-organisent et s'auto-amplifient et qui possèdent un seuil d'activation faible est qu'elles sont faciles à activer localement.

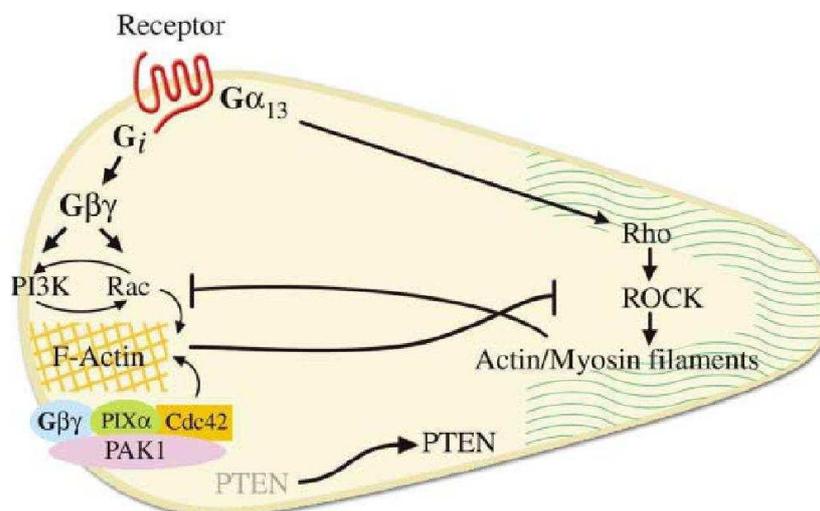


Figure 6_39: Création d'un gradient intracellulaire élevé. La présence de boucles locales de feedback positif ou négatif entre plusieurs protéines, comme illustré ici, à l'avant, avec une boucle de feedback positif entre la PI3K et Rac, ainsi qu'une inhibition mutuelle des voies menant à la polymérisation de l'actine à l'avant et à la rétraction à l'arrière, amplifient grandement le gradient chimique intracellulaire qui devient beaucoup plus élevé que celui extracellulaire qui lui a donné naissance (tiré de Meili and Firtel, 2003).

D'autre part, il faut bien distinguer, le « compas chimiotactique » qui permet la « sensibilité directionnelle » et est donc responsable de l'orientation cellulaire, de la polarisation cellulaire qui traduit juste la forme asymétrique de la cellule avec un front protrudant et un arrière rétractant. La preuve que sensibilité directionnelle et polarisation sont deux mécanismes régulés indépendamment provient d'expériences de chimiotactisme sur des cellules exprimant la protéine fluorescente CRAC-GFP et dont le cytosquelette est dépolymérisé par la latrunculine-A. Soumises à un gradient chimique, ces cellules détectent toujours le gradient et s'orientent vis-à-vis de ce dernier : elles montrent un recrutement de CRAC-GFP face à la source d'AMPc. Pourtant, elles ne peuvent ni protruder, ni rétracter (à cause de la latrunculine-A) et ne sont donc pas polarisées (Fig. 6_40 ; Parent and Devreotes, 1999; Devreotes and Janetopoulos, 2003). Inversement, la sensibilité directionnelle n'est pas nécessaire pour qu'une cellule soit polarisée et se déplace (Insall et al., 1996; Escalante et al., 1997). La sensibilité directionnelle peut exister sans polarité et la polarité peut exister sans sensibilité directionnelle. Actuellement, les acteurs moléculaires qui font partie du compas chimiotactique sont recherchés. Dans des neutrophiles, il a été montré que $PIX\alpha$ (un domaine des protéines PIX qui sont des facteurs d'échange GTP/GDP, qui active notamment Cdc42 et Rac), $G_{\beta\gamma}$, PAK1 (une protéine qui régule l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine), Cdc42, et la $PI3K\gamma$ faisaient partie du compas (Li et al., 2003). Chez *Dictyostelium*, la PI3K fait probablement partie du compas chimiotactique mais elle n'est pas indispensable au bon fonctionnement de ce compas. En effet, un autre mécanisme avec des voies de signalisation indépendantes de la PI3K permet aussi de diriger le mouvement cellulaire, étant donné que des cellules avec PI3Ks inactives (absentes ou inhibées) montrent encore un mouvement directionnel vers la source de chimioattractants (Funamoto et al., 2002).

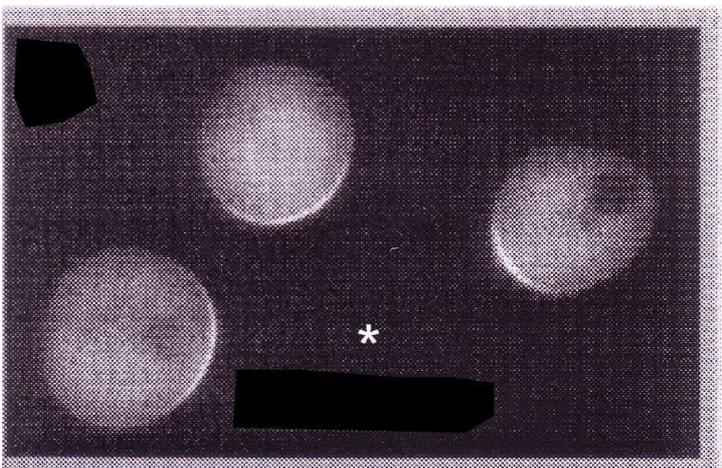


Figure 6_40: Distinction entre sensibilité directionnelle et polarisation cellulaire. Ces cellules exprimant la protéine CRAC-GFP sont traitées avec 0.5 μ M de latrunculine qui provoque la dépolymérisation du cytosquelette d'actine. Soumises à un gradient d'AMPc (bout de la pipette indiqué par l'astérisque), elles montrent un front de CRAC-GFP orienté dans la direction du gradient. Elles ont donc perçues la direction du gradient et sont orientées. Cependant, elles ne sont pas polarisées: elles n'ont ni front avant qui protrude, ni front arrière qui rétracte (tiré de Parent and Devreotes, 1999).

Pour détecter la présence et la direction d'un gradient de chimioattractants, deux mécanismes ont été proposés, un mécanisme de détection temporelle et un mécanisme de détection spatiale. Dans le modèle temporel, la cellule mesure la concentration de chimioattractants au temps t , puis protubère pendant Δt et fait une deuxième mesure de la concentration au temps $t + \Delta t$. La comparaison de ces deux mesures permet à la cellule de prendre une décision : si la concentration a augmenté, le mouvement est maintenu dans la même direction; au contraire, si la concentration diminue, la cellule change d'orientation. Dans le modèle spatial, la cellule compare en permanence l'état d'occupation de ses récepteurs par les chimioattractants tout autour de sa membrane et se dirige vers la concentration maximale de chimioattractants. Les expériences avec cellules *Dictyostelium* traitées à la latrunculine-A, dont je viens de parler plus haut, prouvent que le modèle spatial est valable pour ces cellules qui ne peuvent pas protruder. Ces cellules détectent le gradient et s'orientent en comparant les concentrations de chimioattractants de chaque côté de la cellule. Dans des cellules sauvages non traitées, il est possible que le mécanisme de détection temporelle améliore la détection spatiale, grâce aux mesures à deux temps distincts de concentrations au bout d'un pseudopode qui se développe.

D'autre part, lorsqu'une cellule *Dictyostelium* est soumise à une élévation soudaine et uniforme de la concentration de chimioattractants, celle-ci passe par trois phases successives. D'abord apparaît un cortex d'actine intense sur toute sa périphérie après environ 8 secondes. Puis, dans une deuxième phase, ce cortex disparaît et apparaît un cortex de PTEN ou de myosine-II après environ 30 secondes (Etzrodt et al., 2006). Finalement, ce deuxième cortex disparaît et la cellule fait des protrusions dans différentes directions (on parle aussi de patches ; Postma et al., 2004). Pour expliquer cette réponse à un stimulus uniforme ainsi que celle à un gradient, un modèle a été développé par le groupe de Devreotes. Il s'agit du modèle de locale activation et globale inhibition. Chaque processus (activation et inhibition) est contrôlé par l'occupation des récepteurs à l'AMPc. L'activation locale et rapide augmente proportionnellement à la fraction locale de récepteurs occupés. L'inhibition lente et globale augmente proportionnellement à la fraction globale moyennée sur la cellule de récepteurs occupés. En régime permanent, dans un gradient chimique, à l'avant de la cellule, l'excitation dépasse l'inhibition, ce qui mène à une réponse persistante. A l'arrière, l'inhibition dépasse l'excitation et aucune réponse positive n'apparaît (Fig. 6_41 ; Parent and Devreotes, 1999; Iijima et al., 2002; Janetopoulos et al., 2004).

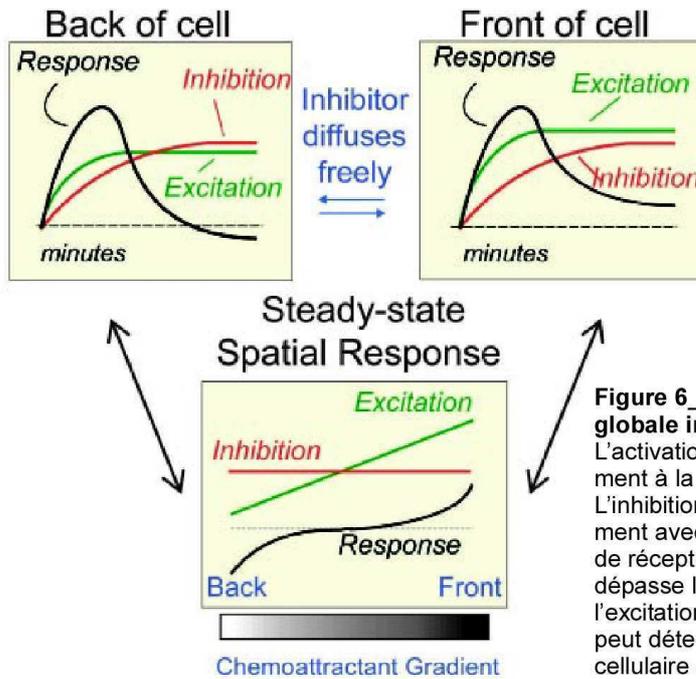


Figure 6_41: Modèle de locale activation et de globale inhibition.
 L'activation locale et rapide augmente proportionnellement à la fraction locale de récepteurs occupés. L'inhibition lente et globale augmente proportionnellement avec la fraction globale moyennée sur la cellule de récepteurs occupés. Ainsi, à l'avant, l'excitation dépasse l'inhibition. A l'arrière, l'inhibition dépasse l'excitation. Ce modèle explique comment une cellule peut détecter la direction d'un gradient chimique extracellulaire (tiré de Janetopoulos et al., 2004).

Des expériences de stimulation uniforme par l'AMPC (application brutale d'une concentration constante d'AMPC) et de changements de position de la micropipette contenant l'AMPC montrent que les cellules *Dictyostelium* sont capables de réarranger leur cytosquelette d'actine en quelques secondes (McRobbie and Newell, 1985; Schleicher and Noegel, 1992; Gerisch et al., 1995; Postma et al., 2004; Etzrodt et al., 2006). Cette réponse rapide nécessite des changements immédiats dans la régulation du réseau de filaments d'actine et montre le caractère très dynamique du cytosquelette.

6.8 La production de forces et leur transmission au substrat

6.8.1 Trois types de forces

Comme nous en avons déjà parlé, dans le cas de billes fonctionnalisées (Noireaux et al., 2000; Wiesner et al., 2003; Marcy et al., 2004) et de la bactérie *Listeria monocytogenes*, il apparaît clair que la polymérisation de l'actine à la surface de l'objet permet de générer des forces de propulsion. Or pour pousser un objet (bille ou cellule ou membrane plasmique), les filaments d'actine doivent rentrer en contact avec cet objet. D'un autre côté, pour polymériser l'actine, de nouvelles sous-unités doivent se glisser entre les extrémités barbées des filaments et l'objet de manière à allonger les filaments et produire les forces qui poussent l'objet. Autrement dit, comment une sous-unité d'actine peut allonger un filament contigu à une

surface ? Il existe plusieurs modèles qui tentent de répondre à cette question. Dans un modèle, « the elastic Brownian ratchet », le filament d'actine est vu comme un ressort qui se courbe constamment du fait de l'énergie thermique. Quand il est courbé, une nouvelle sous-unité de G-actine peut se faufiler au bout. La force est restituée quand le ressort se redresse contre la surface. C'est ce redressement d'un filament allongé qui fournit la force propulsive (Mogilner and Oster, 1996). Un autre modèle propose que les myosines-I, liées aux filaments d'actine et à la membrane plasmique (voir le paragraphe suivant), permettent de pousser la membrane, facilitant ainsi la polymérisation de nouvelles unités d'actine globulaire aux extrémités barbées (pour une revue, voir Mitchison and Cramer, 1996).

Nous avons aussi évoqué la production de forces lors du mouvement d'organites intracellulaires qui se déplacent le long de microtubules. Les mouvements cellulaires peuvent aussi être engendrés par des protéines motrices appelées moteurs moléculaires qui se lient soit à des microtubules (comme la dynéine), soit à des filaments d'actine et utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Des douzaines de protéines motrices différentes ont maintenant été identifiées. Elles diffèrent par le type de filament auquel elles se lient, la direction dans laquelle elles se déplacent le long du filament, et le chargement qu'elles transportent. Les protéines motrices qui se déplacent le long des microtubules appartiennent à l'une des deux familles suivantes : les kinésines qui se déplacent généralement vers l'extrémité plus d'un microtubule, et les dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité moins. Ces protéines motrices jouent un rôle important dans le positionnement des organites limités par une membrane à l'intérieur des cellules eucaryotes (Alberts et al., 1994). Toutes les protéines motrices se déplaçant sur des filaments d'actine identifiées à ce jour appartiennent à la famille des myosines. Le premier moteur moléculaire à avoir été découvert est la myosine-II. Elle est particulièrement abondante dans le muscle squelettique où elle forme la majeure partie de l'appareil contractile. Dans les cellules non musculaires, la myosine-II, préalablement assemblée en filaments épais, permet aussi, comme nous l'avons vu, la contraction du réseau d'actine, grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, et en tirant sur deux filaments d'actine orientés en sens contraires.

Dans les cellules non musculaires, d'autres types de myosines ont ensuite été découverts, en plus de la myosine-II qui reste généralement la myosine la plus abondante. Ces myosines sont des myosines non conventionnelles, dont la mieux caractérisée est la myosine-I (Fig. 6_42). Une seule cellule peut contenir de multiples myosines non conventionnelles, chacune codée par un gène différent et remplissant une fonction différente. Par exemple, *Dictyostelium* a au moins 13 myosines non conventionnelles réparties dans à priori 6 classes

(Soldati, 2003 ; Eichinger et al., 2005). La caractéristique commune de toutes les myosines est un domaine moteur conservé (avec un site de liaison à l'actine et un site de liaison à l'ATP). Les deux autres domaines (le cou et la queue) varient de myosine à myosine et déterminent le rôle spécifique de la protéine. Les queues de myosine peuvent avoir un site de liaison à la membrane plasmique, et/ou un site de liaison à un deuxième filament d'actine et/ou un domaine de liaison à des molécules présentes sur une vésicule. Ainsi, ces protéines de myosine peuvent lier un filament d'actine à la membrane plasmique et le déplacer par rapport à cette membrane, ou faire que deux filaments d'actine s'alignent et glissent l'un par rapport à l'autre, ou déplacer une vésicule le long d'un filament d'actine qui joue le rôle de rail (comme nous l'avons vu avec les microtubules) (Fig. 6_43). Toutes les myosines connues hydrolysent l'ATP pour produire des forces et générer un mouvement. Une grande majorité d'entre elles se déplacent vers l'extrémité barbée des filaments d'actine, mais il a été découvert que la myosine-VI se déplace à grands pas vers l'extrémité pointée des filaments d'actine (Fig. 6_44 ; Rock et al., 2001).

Un troisième type de forces pourraient être produites par l'apparition de pressions hydrostatiques ou osmotiques intracellulaires qui favoriseraient l'avancée du front avant (Sheterline and Rickard, 1989).

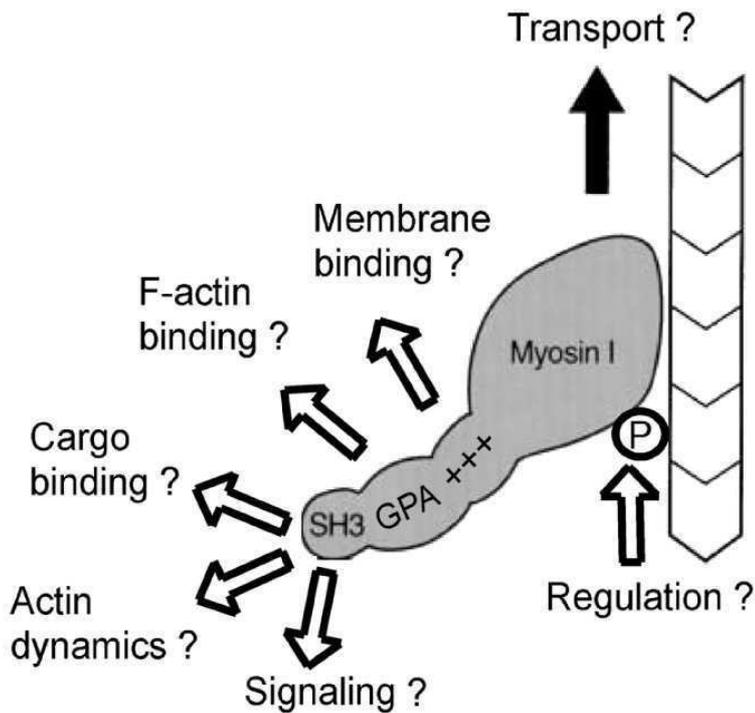


Figure 6_42 (gauche): dessin schématique d'une myosine-I. Le domaine moteur permet le déplacement sur un filament d'actine. Le cou se lie à un nombre variable de chaînes légères. La queue contient de nombreux domaines qui se lient à la membrane, ou à l'actine, ou à des protéines impliquées dans la signalisation, l'endocytose, la dynamique de l'actine, etc ... (tiré de Soldati, 2003).

Figure 6_43 (ci-dessous): Les myosines-I peuvent faire beaucoup de choses: 1) lier deux filaments d'actine ensemble de manière à pousser la membrane, 2) déplacer une vésicule le long d'un filament d'actine qui joue le rôle d'un rail, 4) lier un filament d'actine à la membrane plasmique (tiré de Alberts et al., 1994).

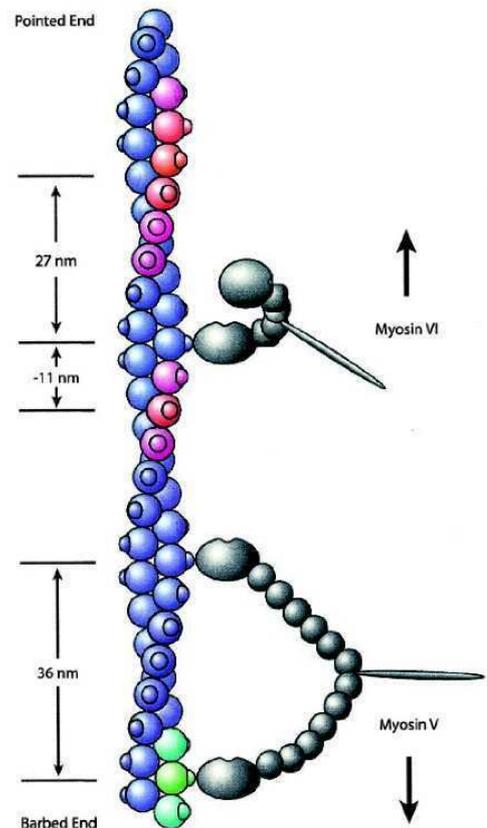
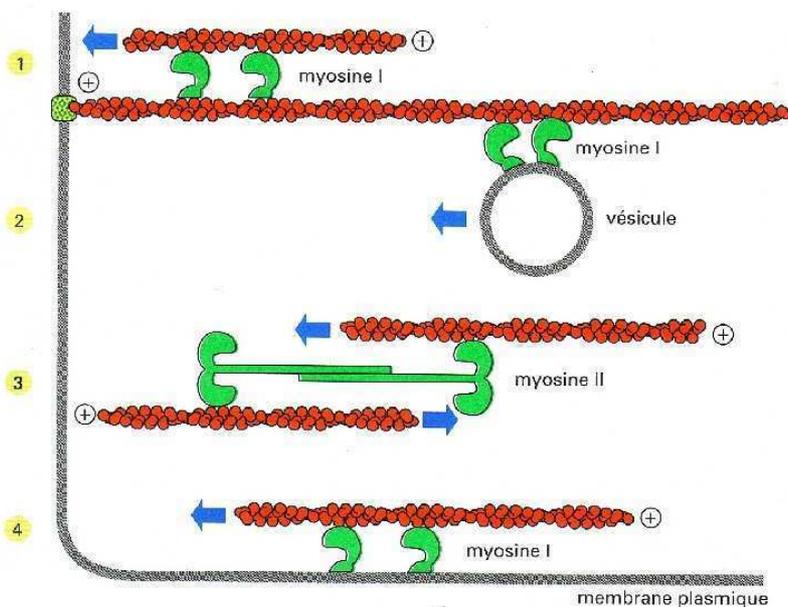


Figure 6_44 (ci-dessous): de nombreuses classes de myosines existent. La myosine-V avec 6 chaînes légères par chaîne lourde effectue un pas de 36 nm vers l'extrémité barbée d'un filament d'actine. La myosine-VI qui n'a qu'une chaîne légère effectue des pas de 27 nm vers l'extrémité pointée d'un filament (alternativement -11 nm vers l'extrémité barbée) (tiré de Rock et al., 2001).

6.8.2 La mesure des forces exercées par les cellules

Pour avancer, les cellules doivent transmettre les forces qu'elles produisent au niveau du substrat ou de la matrice extracellulaire. De nombreuses méthodes ont été développées pour mesurer les forces de traction exercées par différents types cellulaires. En 1980, Harris et al. développent un film fin de silicone polymérisé déposé sur une couche de silicone fluide. L'application de forces de compression par une cellule provoque alors la formation de rides. La relation entre les rides et les forces étant compliquée, Lee et al. (1994) rapportent l'utilisation d'un polymère silicone ne formant pas de rides et fiché de billes pour marquer les déformations. Toujours dans le souci d'améliorer ce types de méthodes, Galbraith and Sheetz (1997) introduisent des cantilevers miniatures dans des substrats de silicone micro-structurés. La déflexion de ces cantilevers permet de mesurer les forces appliquées au substrat. En 1999, Pelham and Wang choisissent le polyacrylamide pour éviter la composante visqueuse du silicone et ils y incorporent des billes de latex fluorescentes (Fig. 6_45 A). Ce substrat, qui permet d'observer la distribution de protéines fluorescentes simultanément aux forces exercées par la cellule, peut aussi être fonctionnalisé avec des protéines de la matrice extracellulaire. Récemment Balaban et al. (2001) ont développé une technique de fabrication de substrats élastiques de PDMS micro-structurés en surface grâce à des moules (obtenus par lithographie). Selon le moule utilisé, la surface montre soit des creux, soit des marqueurs fluorescents uniformément répartis. Cette technique permet une visualisation simultanée des forces exercées et de la fluorescence de protéines de fusion et évite l'incertitude concernant la connaissance de la position initiale des marqueurs en surface.

Ces mesures permettent de dessiner une carte typique des forces (module et direction) transmises au substrat par différents types cellulaires (Fig. 6_45 ; Fig. 6_46 ; Fig. 6_47).

D'autres techniques complètement différentes sont aussi utiles pour mesurer les forces cellulaires de traction. Choquet et al. (1997) ont mesuré les forces exercées sur une bille par des fibroblastes avec un microscope à pinces optiques. Enfin, Fukui et al. (2000) ont appliqué des forces de centrifugation en augmentant régulièrement la vitesse de rotation pour atteindre la limite à laquelle des cellules *Dictyostelium discoideum* ne pouvaient plus migrer contre ses forces. Ceci leur a permis de mesurer la force globale maximale que peut exercer une cellule, qui vaut entre 1 et 2 nN pour une cellule *Dictyostelium* (tableau 6_1 récapitulant ces techniques et les valeurs correspondantes de forces mesurées).

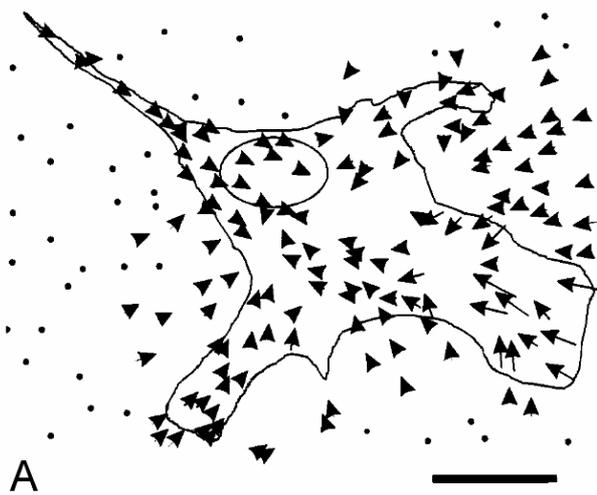
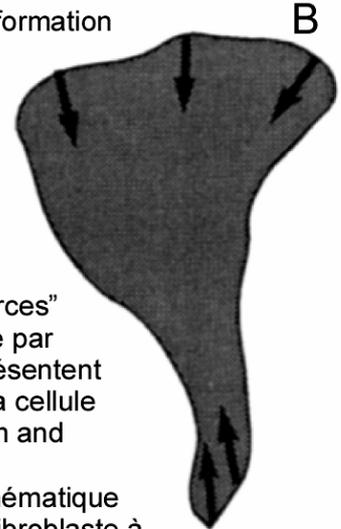


Figure 6_45 : A) (gauche) Déformation d'un substrat de polyacrylamide par un fibroblaste. Les déformations sont visualisées grâce à des billes de latex fluorescentes (points noirs). Les flèches indiquent le mouvement des billes entre la situation "cellule sur le substrat exerçant des forces" et la situation "cellule détachée par un agent chimique". Elles représentent donc les forces exercées par la cellule barre de 20 μm (tiré de Pelham and Wang, 1999).



B) (droite) Représentation schématique des forces appliquées par un fibroblaste à l'avant et à l'arrière de la cellule (tiré de Lee et al., 1994).

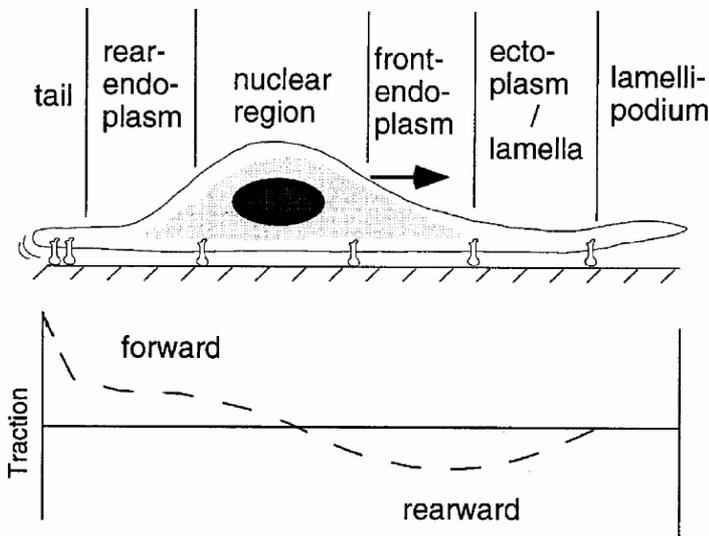


Figure 6_46: direction et module des forces de traction exercées par des fibroblastes mesurées avec un substrat de silicone contenant des cantilevers miniatures. A l'avant comme à l'arrière, les forces sont dirigées vers le centre de la cellule. Les forces changent de direction au niveau du noyau. A l'arrière, les forces exercées peuvent être très grandes (tiré de Galbraith and Sheetz, 1997). La flèche indique la direction de migration.

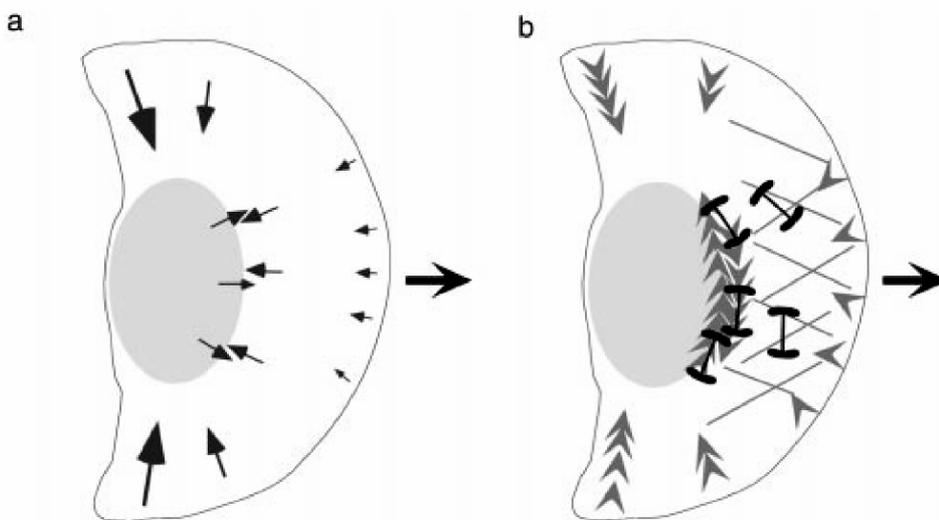


Figure 6_47: Forces exercées par un kératocyte. La condensation du système actine-myosine-II à proximité du noyau correspond à la région d'inversion de la direction des forces exercées par la cellule. Sur les côtés, la cellule exerce des forces de compression orthogonales à la direction de migration. a) Forces de traction mesurées. b) Orientation du réseau d'actine (pointeurs) et des filaments de myosine-II (haltères). La flèche indique la direction de migration (tiré de Galbraith and Sheetz, 1999).

Type cellulaire	Forces exercées	Technique de mesure	références
Kératocytes	De 10 à 20 nN sur une bille	Substrat viscoélastique de silicone avec billes de latex	Lee et al., 1994
Fibroblastes	0,87 +/- 0,43 nN/ μm^2 (avant) 0,99 +/- 0,47 nN/ μm^2 (arrière) 3,91 +/- 1,37 nN/ μm^2 (extrémité arrière)	Substrat de silicone avec cantilevers miniatures	Galbraith and Sheetz, 1997
Kératocytes	0,2 nN/ μm^2 (ventral) 0,4 +/- 0,3 nN/ μm^2 (dorsal)	Substrat de silicone avec cantilevers miniatures et pinces optiques	Galbraith and Sheetz, 1999
Fibroblastes	De 5 à 50 nN sur une bille	Pinces optiques	Choquet et al., 1997
Fibroblastes	2 nN/ μm^2	Substrat élastique de polyacrylamide truffé aléatoirement de billes de latex fluorescentes	Pelham and Wang, 1999 ; Dembo and Wang, 1999
Fibroblastes	5,5 +/- 2 nN/ μm^2 i.e. entre 2 et 25 nN par contact focal	Substrat élastique de PDMS micro-structuré avec répartition uniforme de plots fluorescents (techniques de lithographie)	Balaban et al., 2001
<i>Dictyostelium discoideum</i> (végétatives)	Force globale entre 1 et 2 nN selon la souche	Centrifugation	Fukui et al., 2000
<i>Dictyostelium discoideum</i> (végétatives)	Force globale de 4 nN. Force de 1 nN générée par un pseudopode d'environ 10 μm^2 (100 Pa)	Hydrogel d'acide hyaluronique (sur substrat de verre) recouvert aléatoirement de billes de polystyrène	Ladam et al., 2005
<i>Dictyostelium discoideum</i> (agrégatives)	129 +/- 20 pN/ μm^2 (Pa)	Substrat élastique de polyacrylamide fiché aléatoirement de billes de latex fluorescentes et couverture de polyacrylamide	Tsujioka et al., 2004

Tableau 6_1: Mesures des forces exercées par différents types cellulaires.

6.8.3 La transmission des forces au substrat

L'étude de Balaban et al. (2001) montre clairement que les forces produites par des fibroblastes sont transmises au substrat au niveau des contacts focaux (Fig. 6_48).

Chez *Dictyostelium discoideum*, Uchida et Yumura (2004) ont montré, en utilisant un substrat de silicone truffé de billes fluorescentes, que les forces de traction sont exercées sur le substrat au niveau des actin foci (Fig. 6_49).

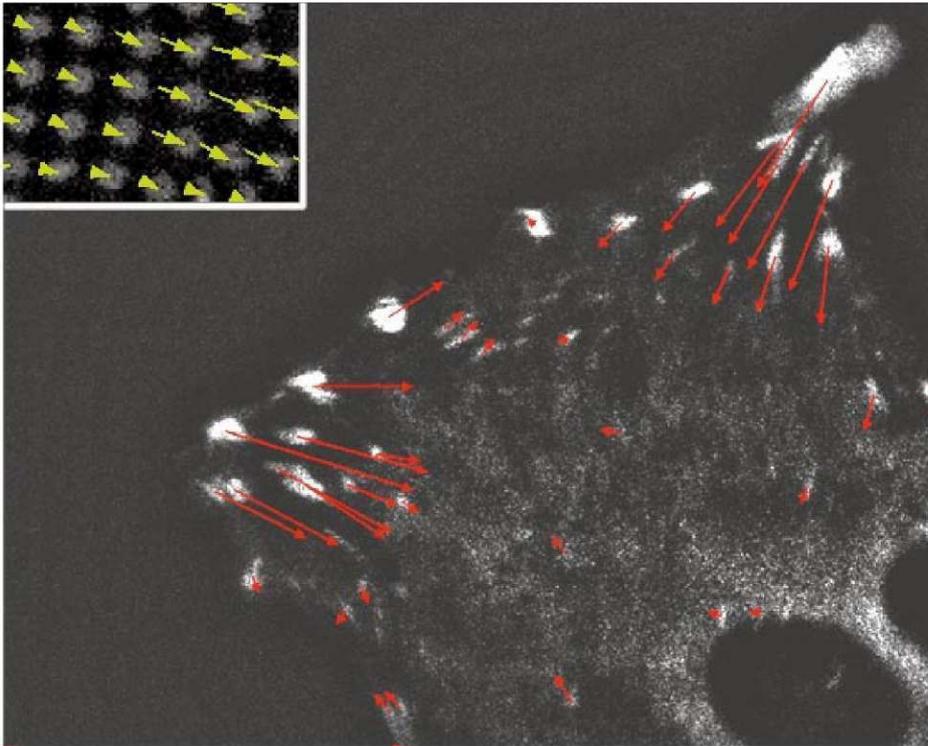


Figure 6_48: Les forces produites par les fibroblastes sont transmises au substrat au niveau des contacts focaux. Les flèches rouges indiquent les forces exercées. Les adhésions focales sont visualisées grâce à la GFP-vinculine (tiré de Balaban et al., 2001).

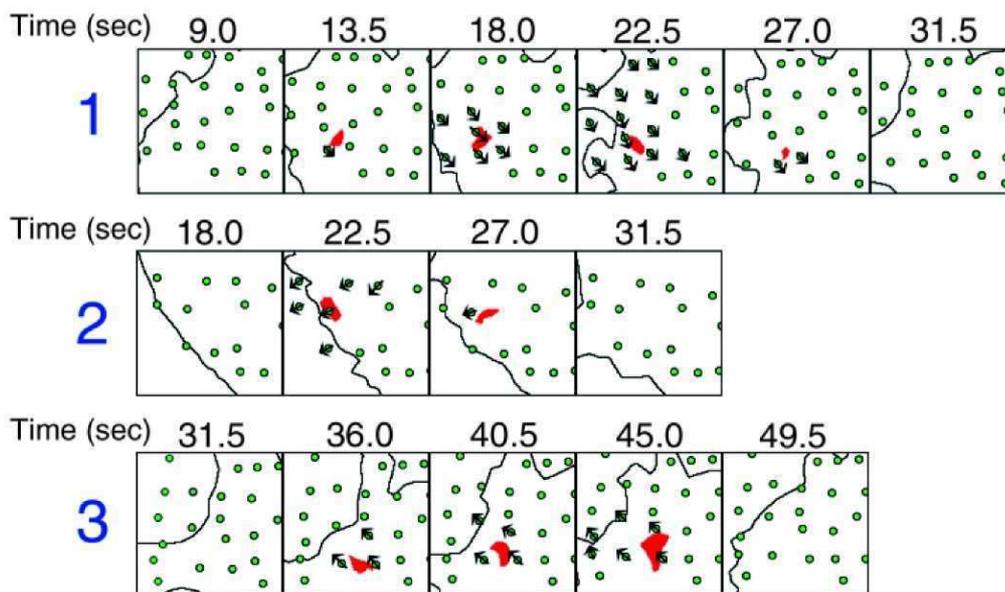


Figure 6_49: Les forces de traction exercées par *Dictyostelium* sont transmises au substrat au niveau des foyers d'actine. Les foyers d'actine sont représentés en rouge. Les points verts sont les positions de billes dans le substrat de silicone. Les flèches représentent le déplacement des billes (tiré de Uchida et Yumura, 2004).

6.9 Réponses à l'application de forces mécaniques. Mécanosensibilité et mécanotransduction

6.9.1 Généralités

Pour percevoir leur environnement, les cellules ont développé de nombreux capteurs qui permettent de détecter des stimuli extérieurs, comme des sources d'énergie (Taylor et al., 1999; Bonner and Lamont, 2005), des gradients chimiques (comme vu plus haut; Gerisch, 1982), la rigidité du substrat (Lo et al., 2000; Discher et al., 2005), une contrainte osmotique (Martinac et al., 1987), ou encore des forces mécaniques (pour des revues, voir Gillespie and Walker, 2001; Geiger and Bershadsky, 2002).

Les forces mécaniques contrôlent des processus cellulaires cruciaux (Chen et al., 1997; Lee et al., 1999; Kiehart et al., 2000), et la mécanosensibilité qui est la capacité de détecter et de mesurer des forces mécaniques extérieures, joue des rôles essentiels dans des mécanismes biologiques tels la morphogenèse (Hardin and Walston, 2004; Ingber, 2006), le remodelage des os (Klein-Nulend et al., 2005), la régulation du réseau vasculaire (Langille and O'Donnell, 1986; Davies, 1995), la guérison d'une blessure ou la cicatrisation (Hsu et al., 2001), l'écoute (Corey et al., 2004) et le toucher (O'Hagan and Chalfie, 2005). De nombreuses pathologies sont associées à la mécanosensibilité comme l'athérosclérose (Nerem, 1992; Davies et al., 2002), l'hypertrophie cardiaque (Sadoshima and Izumo, 1997), et des cancers (Huang and Ingber, 2005).

Les études sur la mécanosensibilité se sont d'abord beaucoup concentrées sur les canaux mécanosensibles et la découverte de tels canaux a permis de prouver la capacité de mécanosensibilité dans de très nombreux organismes comme des bactéries, des protozoaires, des plantes, des invertébrés et des vertébrés comme l'être humain (pour des revues, voir Sachs and Morris, 1998; Hamill and Martinac, 2001; tableau 6_2 montrant la diversité des organismes mécanosensibles).

L'audition, le toucher sont des sens qui nécessitent l'activation de canaux mécanosensibles par des stimulations mécaniques. Dans la perception des sons et des contacts, les canaux jouent un rôle central, et leur activation dépend de structures telles le cytosquelette. Ceci est illustré dans les Figures 6_50 à 6_53. Les cellules impliquées dans l'audition (cellules ciliées), le toucher, et les autres sens, sont appelées cellules spécialisées ou cellules sensorielles.

Figure 6_50: Modèle général de la mécano-transduction. Un canal est attaché d'une part au cytosquelette intracellulaire et d'autre part à une structure extracellulaire sur laquelle une force est appliquée. Le canal mécanosensible répond à la tension dans le système due aux déplacements relatifs de ces structures.

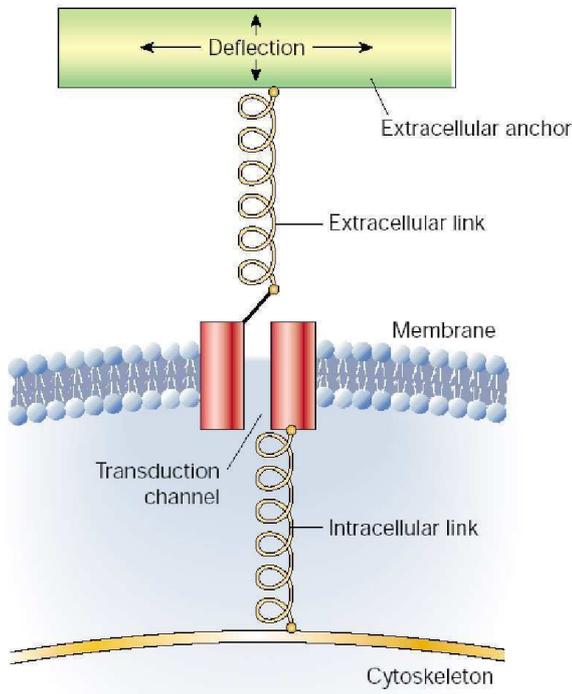


Figure 6_51: Structure de l'oreille interne et modèle de transduction. a, b, c et d) zooms successifs. Le son est transmis par le limaçon (cochlea). Le son donne lieu à des vibrations de la membrane basale de l'organe de Corti. Ces vibrations entraînent la déflexion des stéréocils, liés à la membrane tectoriale. d) Photo SEM des stéréocils. e) Modèle de mécano-transduction. Les liens moléculaires (tip links, flèches blanches en d) entre deux stéréocils provoquent l'ouverture de canaux ioniques au moment de la déflexion (figures tirées de Gillespie and Walker, 2001).

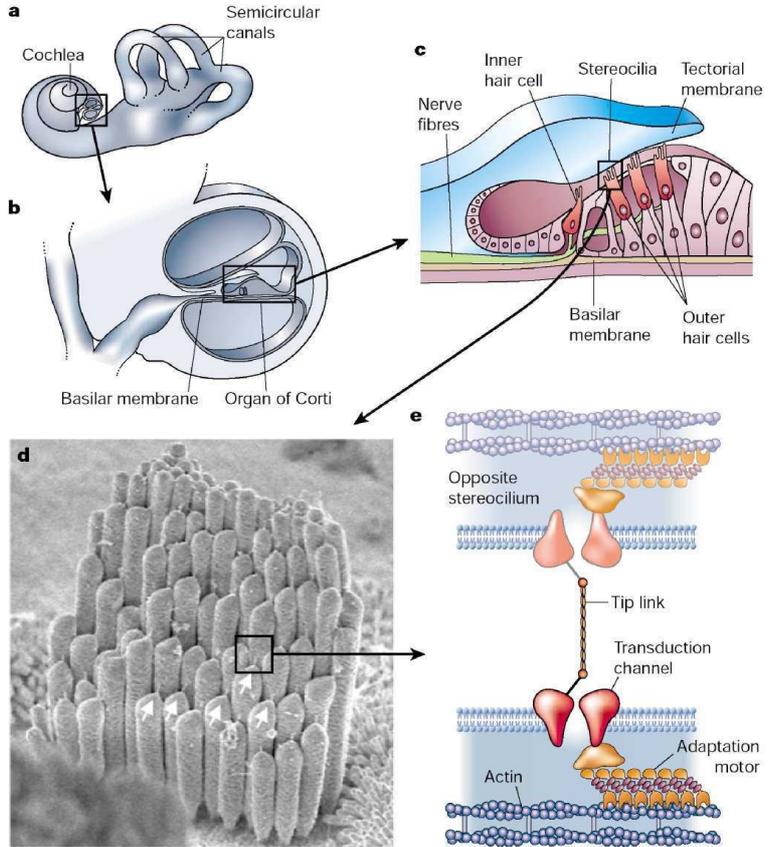


Figure 6_52: Structure du récepteur du poil de *Drosophila* et modèle de mécano-transduction. Le mouvement du poil déplace la dendrite. Ce déplacement est détecté par le neurone. a) zoom sur l'organe mécanosensoriel. b) Photo TEM montrant le cuticule (pointeur). c) Modèle de transduction.

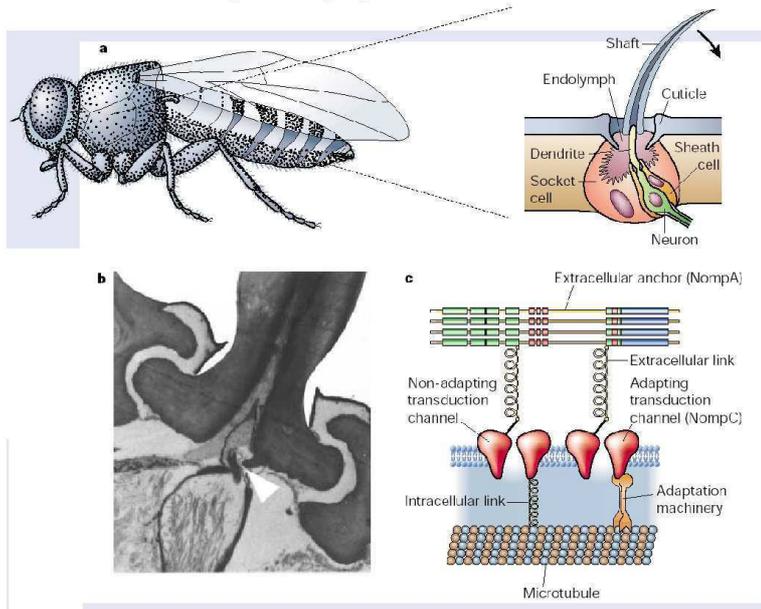
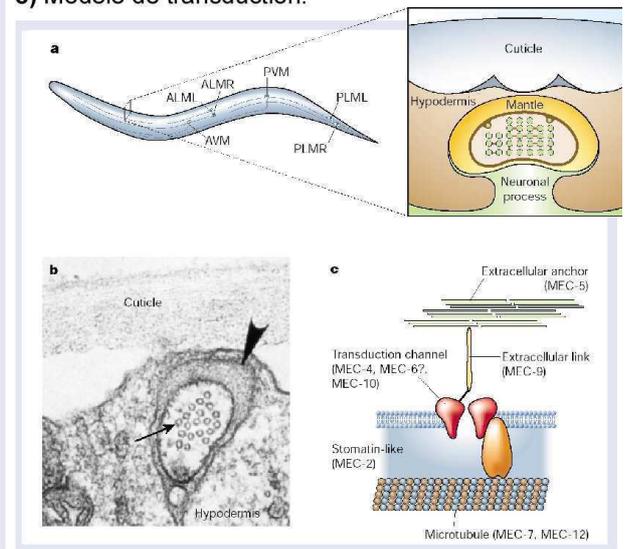


Figure 6_53: Structure et modèle du récepteur du toucher de *C.elegans*. a) Vue de *C.elegans* et zoom sur un mécanorécepteur. b) Photo électronique. Pointeur: manteau. Flèche: 15 protofilaments de microtubules. La déflexion des microtubules relativement au manteau est détectée par des canaux. c) Modèle de transduction.



Type cellulaire/organisme	Mécanorécepteurs (ou mécanotransmetteurs) (non exhaustif)	Référence(s)
Bactérie <i>Escherichia coli</i>	Canaux ioniques, MscM, MscS, MscL	Blount et al., 1999 Hamill and Martinac, 2001 (revue)
Archéobactérie <i>Haloferax volcanii</i>	Canaux ioniques	Kloda and Martinac, 2001
Protozoaires dinoflagellés	Membrane plasmique	Mallipattu et al., 2002
Champignon <i>Uromyces</i>	Canaux ioniques	Zhou et al., 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i> (plante)	Canaux ioniques	Qi et al., 2004
Neurones d'escargot	Canaux ioniques (et cytosquelette)	Small and Morris, 1994
<i>Caenorhabditis elegans</i> (ver) (neurones ciliés, du toucher, et à neurites (10 % des neurones))	Canaux DEG/ENaC, TRP, protéines MEC, microtubules (?), ECM	O'Hagan and Chalfie, 2005
<i>Drosophila</i> (mouche)	Canaux ioniques NOMPC, TRP	Walker et al., 2000
Œuf de Xénope (grenouille)	Canaux ioniques	McBride and Hamill, 1992 ; Zhang and Hamill, 2000
Cellules ciliées (spécialisées)	Stéréocils et canaux ioniques	Howard and Hudspeth, 1988
Cellules de muscle squelettique de souris	Canaux ioniques	Winegar et al., 1996
Cellules du muscle lisse (de l'aorte de rat)	Filaments d'actine	Numaguchi et al., 1999
Kératocytes de poisson	Canaux ioniques	Lee et al., 1999
Os (vertébrés) et ostéocytes	Ostéocytes, peut-être des canaux ioniques	Burger and Klein-Nulend, 1999 (revue)
Neurones de l'hippocampe de rat	Canaux ioniques (TREK, ...)	Lauritzen et al., 2005
Cellules du cœur de poulet	Canaux ioniques	Hu and Sachs, 1996
Cellules endothéliales de divers vertébrés	Contacts focaux (intégrines), protéoglycanes, réseaux d'actine et de microtubules, membrane plasmique, canaux ioniques, récepteurs à activité tyrosine kinase, ...	Li et al., 2005 (revue)
Cellules épithéliales (de souris)	Canaux ioniques, réseau d'actine et MTs	Alenghat et al., 2004
Fibroblastes de divers vertébrés	Contacts focaux, F-actine, canaux ioniques	Stockbridge and French, 1988 ; Riveline et al., 2001

Tableau 6_2: Diversité des organismes mécanosensibles.

Intéressons-nous maintenant aux cellules non spécialisées qui montrent des caractéristiques mécanosensibles. En particulier, examinons certains mécanismes mécanosensibles dans les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les kératocytes, les globules blancs, les fibroblastes et enfin l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

6.9.2 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent tous les vaisseaux sanguins. Elles développent et remodelent le réseau vasculaire et permettent ainsi la croissance et la réparation tissulaires.

Les cellules endothéliales ont fait et font toujours l'objet de très nombreuses recherches sur la mécanosensibilité et la migration sous flux. Ainsi, de nombreux mécanorécepteurs et de nombreuses voies de signalisation jouant un rôle dans la mécanotransduction ont été décrits (pour des revues, voir Davies et al., 1997 ; Li et al., 2005).

De plus en plus d'observations, dont beaucoup ont été faites dans des chambres à flux, suggèrent qu'un flot hydrodynamique de cisaillement peut moduler chaque étape de la migration de ces cellules, comme l'extension du front avant, l'adhérence à la matrice extracellulaire et la rupture des liens adhésifs à l'arrière lors de la rétraction.

Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré qu'un flux laminaire de cisaillement pouvait stimuler la migration des cellules endothéliales (ECs) dans le cadre de la guérison d'une blessure (wound healing). Quand la blessure (le sillon dénudé) est perpendiculaire à la direction du flux, le flux stimule la migration des cellules du bord amont mais pas la migration des cellules du bord aval (Fig. 6_54 ; Hsu et al., 2001). Cela constitue un exemple de réorganisation polarisée par le flux du cytosquelette et des liens cellule-substrat (alternativement des liens cellule-matrice extracellulaire (ECM) *in vivo*).

Un autre exemple d'effet spectaculaire de l'application d'un flux laminaire sur une couche confluente de cellules endothéliales est le changement de forme des cellules, leur alignement dans la direction du flux et la réorganisation du réseau d'actine avec production de fibres de tension (Fig. 6_55 ; Malek and Izumo, 1996). Ce mécanisme d'élongation dans la direction du flux dépend de l'activité d'une tyrosine kinase, du calcium intracellulaire et nécessite un réseau intact de microtubules. Cette réorganisation du cytosquelette et des liens cellule-cellule s'effectue sur des périodes de temps de l'ordre de 24 heures avec des contraintes de cisaillement appliquées de l'ordre de 2 Pa.

De nombreuses structures et protéines ont été identifiées comme mécanorécepteurs ou mécano-transducteurs dans les cellules endothéliales.

Ainsi, les molécules d'adhésion comme les intégrines sont des mécanorécepteurs qui transmettent les signaux mécaniques au cytosquelette (Wang et al., 1993). Ces auteurs ont en effet montré l'existence d'un mécanisme de durcissement du cytosquelette qui dépend des forces appliquées au niveau de molécules adhésives (Fig 6_56). Les forces, de 0 à 4 N/m², sont appliquées sur la surface cellulaire grâce à des micro-billes magnétiques recouvertes d'un peptide contenant la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui est un ligand spécifique pour les récepteurs de la fibronectine, une des principales protéines de l'ECM. Leurs résultats montrent donc l'existence d'une connexion directe entre les zones d'adhésion aux billes et le cytosquelette ainsi qu'une résistance du cytosquelette proportionnelle aux forces appliquées.

L'application d'un flux de cisaillement sur une couche confluente d'ECs augmente la taille mais diminue le nombre des adhésions focales et cette réorganisation non polarisée est contrôlée par la polymérisation des filaments d'actine ancrés aux points focaux d'adhésion. Dans le cas de cellules non confluentes, autrement dit isolées, cette réorganisation est dirigée et plus dynamique. Le flux provoque alors la production de lamellipodes qui est suivie par la formation de nouveaux points focaux d'adhésion sous les lamellipodes et dans la direction du flux. Les points focaux déjà existant sous le corps cellulaire grossissent ou fusionnent sous l'effet du flux, ce qui correspond à une réponse immédiate pour résister au détachement cellulaire. Ce phénomène est transitoire et les points focaux d'adhésion se désassemblent peu après pour permettre la migration avec le flux. Les points focaux sont alors créés uniquement sous les lamellipodes du front avant et ils sont fixes par rapport au substrat et servent donc de piste pour le corps cellulaire, avant de se désassembler (pour un modèle de migration des cellules endothéliales sous flux, voir la Figure 6_57 et la revue Li et al., 2005). Le flux induit l'activation soutenue des intégrines, activation qui nécessite la liaison des protéines de la matrice avec leurs intégrines spécifiques. L'application du flux augmente aussi l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$.

D'autres molécules surfaciques jouent un rôle important pour détecter la direction d'un flux de cisaillement. En particulier, les protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate (HSPGs pour heparan sulfate proteoglycans) sont des glycoprotéines qui peuvent se lier à l'ECM et dont la disruption inhibe la directionnalité de la migration induite par un flux, tout en augmentant la vitesse des cellules.

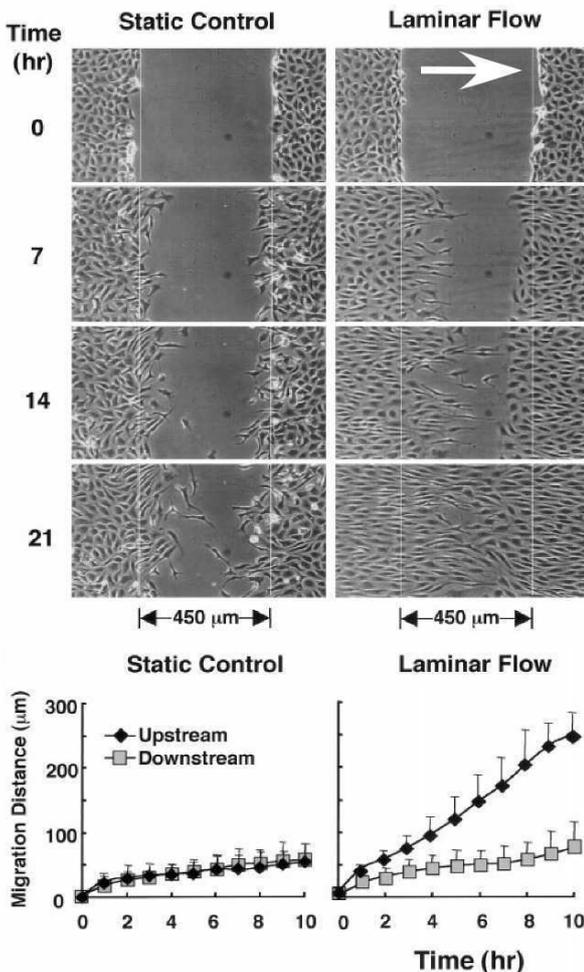


Figure 6_54: l'application d'un flux laminaire (flèche) sur un lit de cellules endothéliales dénudé stimule la migration des cellules du bord amont (tiré de Hsu et al., 2001).

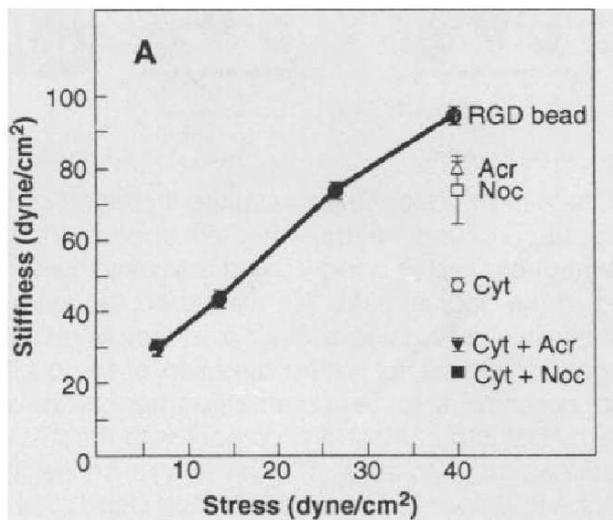


Figure 6_56: Mécanisme de durcissement du cytosquelette proportionnellement aux forces appliquées. La rigidité du cortex augmente linéairement avec la contrainte appliquée (tiré de Wang et al., 2003).

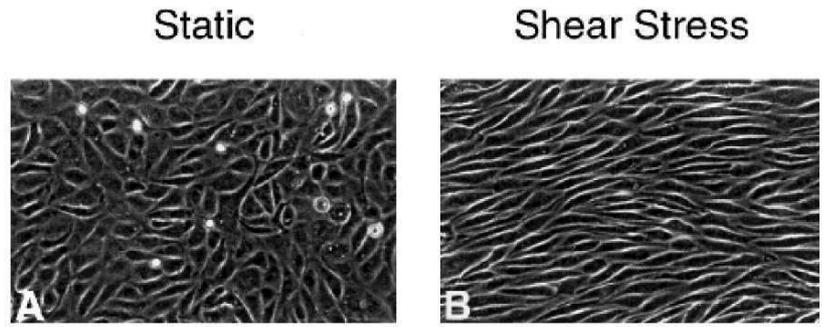


Figure 6_55: l'application d'un flux laminaire de 2 Pa pendant 24 heures sur une couche confluente de cellules endothéliales induit des changements morphologiques avec alignement dans la direction du flux (tiré de Malek and Izumo, 1996).

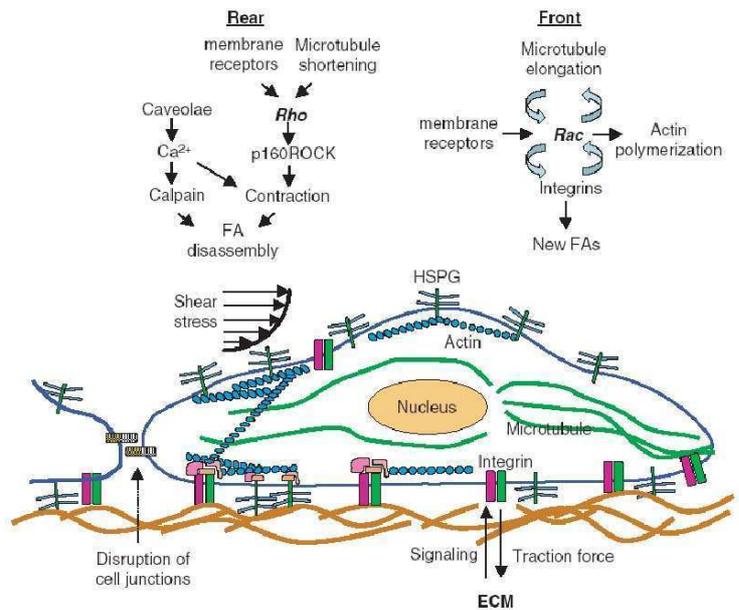


Figure 6_57 (ci-dessus): Modèle de migration cellulaire des cellules endothéliales sous flux (tité de Li et al., 2005).

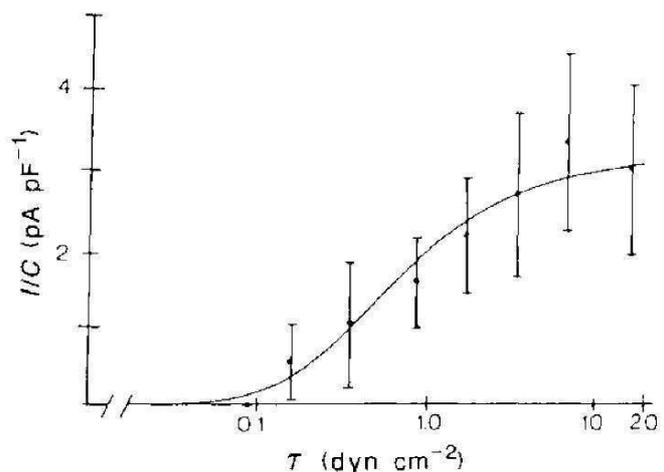


Figure 6_58: les cellules endothéliales possèdent des canaux ioniques mécanosensibles. Expérience de patch-clamp sur cellule entière sous flux. Le courant ionique augmente avec la contrainte de cisaillement (tiré de Olesen et al., 1988).

Les structures du cytosquelette, comme nous l'avons déjà évoqué, jouent aussi un rôle très important dans la mécanotransduction. Ainsi, la disruption des filaments d'actine ou du réseau de microtubules inhibe l'alignement cellulaire provoqué par l'application d'un flux laminaire sur une couche confluente d'ECs. La disruption des filaments d'actine inhibe aussi l'activation par le flux de FAK, une kinase qui participe à la signalisation au niveau des intégrines (Focal Adhesion Kinase). D'autre part, les structures du cytosquelette jouent aussi le rôle de mécano-effecteurs et l'application d'un flux hydrodynamique active de très nombreuses voies de signalisation pour réguler la réorganisation du réseau d'actine et les changements de morphologies cellulaires. Par exemple, l'alignement cellulaire dans la direction du flux et la production de fibres de tension nécessitent le relâchement de calcium intracellulaire, l'activation de tyrosine kinases, de Rho/p160ROCK, Rac et Cdc42 (qui sont trois protéines de la famille des RhoGTPases), des kinases p38MAPK et p65PAK. De façon générale, les protéines de la famille des RhoGTPases sont des régulateurs majeurs du cytosquelette. Ces protéines régulent aussi l'activation des intégrines.

Les réponses vues jusqu'ici nécessitent plusieurs heures d'application du flux. Néanmoins, les cellules endothéliales non confluentes peuvent aussi réagir à un stimulus hydrodynamique sur une échelle de temps beaucoup plus courte de l'ordre de la seconde ou de la minute, comme lors de la formation de lamellipodes tout autour de la cellule suite à l'application d'un flux (Li et al., 2002). Cette formation de lamellipodes n'est pas associée à une réorganisation significative des fibres de tension. En quelques minutes, un flux laminaire de cisaillement augmente aussi les forces de traction générées par la cellule avec des forces de traction plus importantes sur le contour cellulaire (Shiu et al., 2004). Ce mécanisme pourrait être lié à l'augmentation transitoire de la taille des points focaux d'adhésion.

La membrane plasmique elle-même pourrait jouer un rôle dans la mécanotransduction des cellules endothéliales. Il a été montré qu'un flux de cisaillement pouvait augmenter la fluidité de la membrane, activer des protéines G et initier des cascades de signalisation des caveolae qui sont des invaginations de la membrane plasmique (Gudi et al., 1996 ; Haidekker et al., 2000). L'activation des protéines G (qui a lieu dans la seconde) et de ces cascades des caveolae pourrait mener à l'activation de Rho et ainsi accroître la contractilité des fibres de tension à l'arrière des cellules endothéliales. De plus, une vague de calcium induite par l'application d'un flux peut être initiée des caveolae à l'arrière des cellules. Ceci pourrait stimuler p160ROCK et la contraction du système actine-myosine, provoquant ainsi le désassemblage des points focaux d'adhésion et favorisant la rétraction du bord arrière.

Les structures d'adhérence cellule-cellule, un peu comme les structures du cytosquelette pourraient aussi jouer un rôle à la fois en tant que mécano-effecteurs et que mécano-transducteurs. Le flux agit sur les jonctions adhérentes (adherens junctions) en les cassant et en diminuant l'expression de la VE-cadhérine qui est une molécule d'adhésion majeure des jonctions d'adhérence. On a donc ici un rôle de mécano-effecteurs qui, en se cassant, permettent en plusieurs heures, la réorganisation du cytosquelette et les changements de morphologies cellulaires. Cela suggère une coordination entre les réorganisations du cytosquelette et des zones d'adhérence cellule-cellule. D'un autre côté, des observations suggèrent un rôle de mécano-transducteurs des protéines contenues dans les adhésions cellule-cellule. En effet, en réponse à un flux, un complexe contenant la VE-cadhérine, la β -caténine et un récepteur de facteur de croissance, se forme. Ce complexe est nécessaire pour l'activation induite par le flux de Akt et p38MAPK (Shay-Salit et al., 2002).

Enfin, les cellules endothéliales possèdent aussi des canaux ioniques mécanosensibles (Lansman et al., 1987 ; Olesen et al., 1988 ; Fig. 6_58). Ces canaux mécanosensibles permettent une réponse très rapide à l'application d'un flux hydrodynamique de cisaillement.

6.9.3 Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales forment des feuillets cellulaires cohérents appelés épithéliums qui tapissent les surfaces internes et externes du corps (Fig. 6_59).

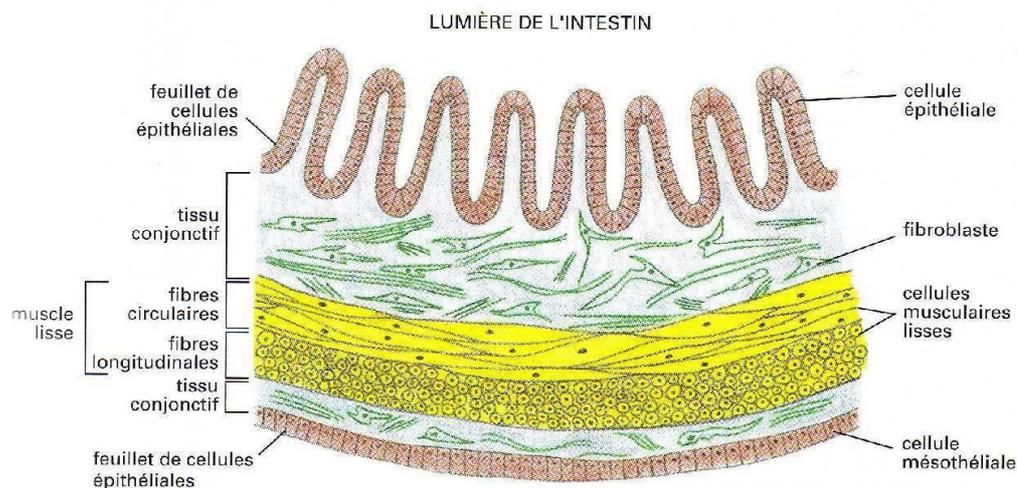


Figure 6_59: Les cellules épithéliales forment des feuillets cellulaires cohérents qui tapissent les surfaces internes et externes du corps (tiré de Alberts et al., 1994).

Certaines cellules épithéliales de rein (murine embryonic kidney epithelial cells) répondent aux augmentations de la contrainte de cisaillement exercé par un fluide sur leur surface apicale en augmentant rapidement l'influx de calcium à travers des canaux ioniques

mécanosensibles (polycystine-2) et ensuite en amplifiant cette réponse par la libération, induite par le calcium, de calcium des stocks intracellulaires (calcium-induced calcium release ; Nauli et al., 2003). Cette réponse mécanosensible est initiée par la courbure par le flux du cil primaire sur la surface apicale de ces cellules.

Le même laboratoire à l'origine de ces résultats a ensuite montré, sans contradiction avec les premières conclusions, que cette réponse mécanosensible, bien qu'entraînant, comme observé plus tôt, un pic de calcium du fait de l'activation locale du canal calcique polycystine-2 au niveau du cil primaire, était en fait contrôlée par des contraintes mécaniques globales, faisant intervenir la notion de précontrainte dans l'ensemble du cytosquelette (Alenghat et al., 2004). En effet, l'élimination des filaments d'actine, ou des microtubules, ou de la tension générée par le système actine-myosine, ou des contacts adhésifs à la matrice extracellulaire utilisant des intégrines, provoque la disparition du pic de calcium en réponse aux contraintes hydrodynamiques (Fig. 6_60). On a donc un contrôle global de la mécanotransduction, à l'échelle de la cellule, par les structures du cytosquelette dans ces cellules épithéliales.

Cet échange croisé (dont nous verrons d'autres exemples) entre signaux perçus et transmis par les structures du cytosquelette ou par des canaux ioniques mécanosensibles est assez répandu et apparaît par exemple dans des neurones (Lauritzen et al., 2005).

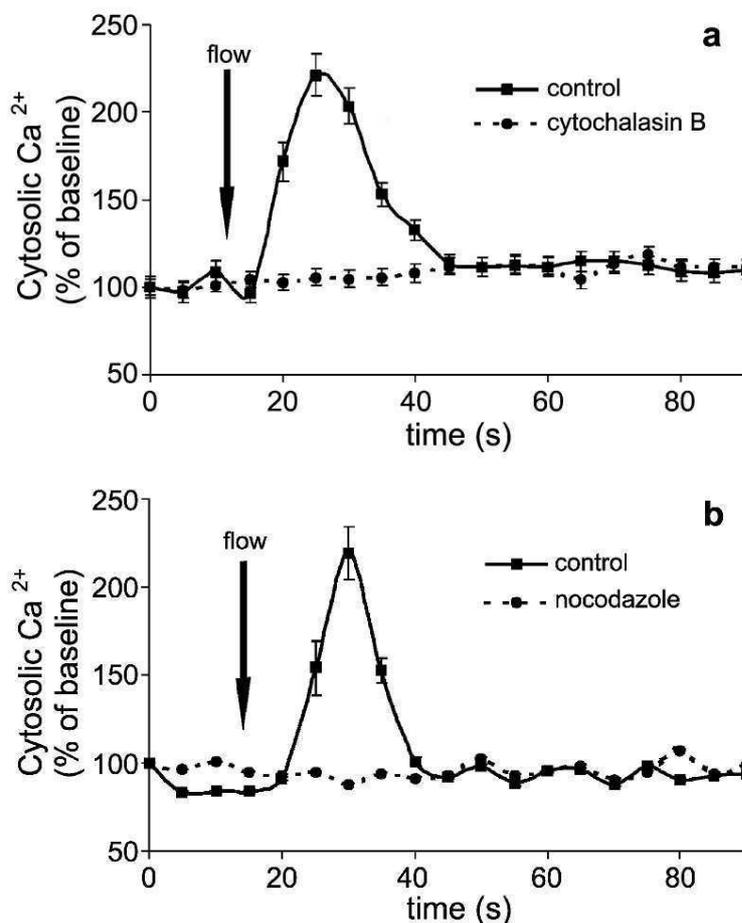


Figure 6_60: La réponse mécanosensible des cellules épithéliales nécessite des réseaux d'actine et de microtubules intacts.

L'élimination des filaments d'actine avec de la cytochalasine B (a) ou des microtubules avec du nocodazole (b) provoque la disparition du pic de calcium normalement observé en réponse à des contraintes hydrodynamiques (tiré de Alenghat et al., 2004).

6.9.4 Les kératocytes

Un modèle cellulaire très utilisé pour l'étude de la migration cellulaire est le kératocyte de l'épiderme de poisson (fish epidermal keratocyte), qui est isolé à partir d'écaillés de poisson.

En combinant les microscopies de contraste de phase et de fluorescence avec des indicateurs fluorescents du calcium, l'utilisation de drogues telles l'EGTA ou le gadolinium, l'application de contraintes mécaniques à l'aide de substrats élastiques (Fig. 6_61) et des mesures par « patch-clamp » sur une portion de membrane ou sur cellule entière, Lee et al. (1999) ont montré que les kératocytes de poisson possèdent des canaux calciques mécanosensibles. De plus, l'activation de ces canaux conduit à la libération de calcium des stocks intracellulaires induite par l'entrée de calcium extracellulaire (calcium-induced calcium release). Cette augmentation de la concentration de calcium dans la cellule stimule la rétraction du bord arrière et les auteurs proposent un mécanisme général de régulation de la migration cellulaire (Fig. 6_62).

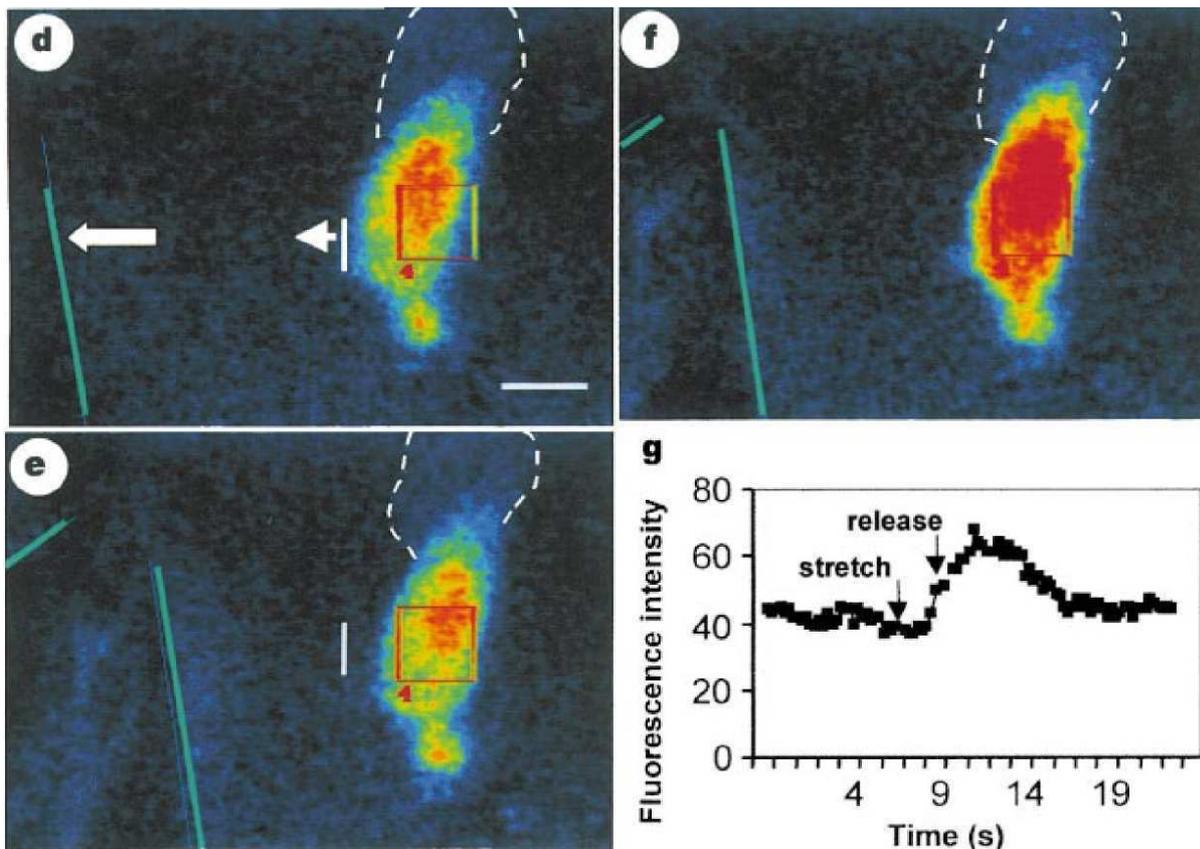


Figure 6_61: Les kératocytes de poisson possèdent des canaux calciques mécanosensibles. **d)** Une aiguille est utilisée pour déformer un substrat élastique dans la direction indiquée par la flèche. **e)** Après 2 sec d'application de la contrainte, on laisse l'aiguille revenir à sa position initiale. **f et g)** En réponse au stress mécanique, la cellule expérimente une augmentation transitoire de la concentration de calcium. Cette augmentation est visualisée grâce à un indicateur fluorescent du Ca^{2+} (tiré de Lee et al., 1999).

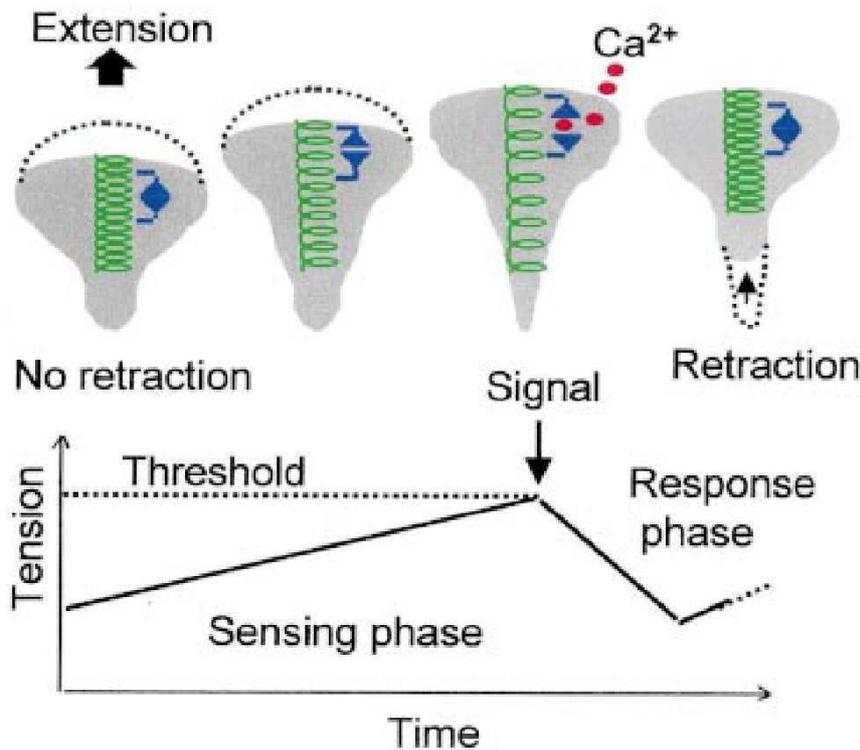


Figure 6_62: Modèle de migration de kératocytes. Le cytosquelette est représenté comme un ressort (vert) relié aux canaux calciques (bleu). Lors de l'extension de la cellule (pointillés), la contrainte sur le cytosquelette augmente. Quand un seuil critique est atteint, les canaux calciques sont activés, provoquant un influx de calcium extracellulaire (rouge) et une augmentation transitoire de la concentration de calcium, ce qui entraîne la rétraction de l'arrière et la diminution de la contrainte exercée sur le cytosquelette (tiré de Lee et al., 1999).

6.9.5 Les leucocytes

Les leucocytes, ou globules blancs, sont des cellules qui circulent dans les vaisseaux sanguins et qui, lorsqu'une zone infectée apparaît, adhèrent à la paroi du vaisseau au voisinage de cette zone, puis roulent sur les cellules endothéliales constituant la paroi pour finalement traverser la paroi et migrer vers la zone infectée par chimiotactisme (Figs 6_63 et 6_64).

Plusieurs études se sont intéressées à la réponse des leucocytes à l'application de forces mécaniques. Moazzam et al. (1997) observent que des leucocytes étalés sur un substrat rétractent immédiatement leurs protrusions lors de l'application d'un flux hydrodynamique (d'environ 0,1 Pa) provenant d'une micropipette. Lorsque le flux est arrêté, des pseudopodes sont à nouveau projetés (Fig. 6_65). Dans une étude utilisant la même technique de stimulation mécanique avec un flux de liquide expulsé d'une micropipette, Coughlin and Schmid-Schonbein (2004) aboutissent à des résultats qui semblent contradictoires avec ceux de Moazzam et al. (1997). En effet, Coughlin and Schmid-Schonbein (2004) appliquent une marche de flux de cisaillement avec un taux de cisaillement et un temps d'application du flux définis et montrent que les leucocytes, initialement ronds (passifs), émettent des pseudopodes en réponse à l'application du stimulus mécanique. L'arrêt du flux semble même être un signal provoquant la rétraction des pseudopodes. De plus, plus la contrainte de cisaillement est importante (entre 0 et 0,4 Pa), plus le nombre de cellules répondant au stimulus mécanique en

émettant des pseudopodes est grand et plus l'étalement cellulaire est important. L'étalement cellulaire augmente aussi avec la durée d'application du flux. Par contre, le temps de réponse (temps séparant le début d'application du flux et l'apparition de la première protrusion) est indépendant de la contrainte de cisaillement. Les cellules sont sensibles à des contraintes de cisaillement aussi faibles que 0,02 Pa.

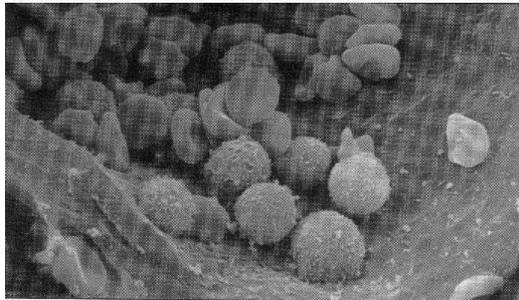


Figure 6_63: Photographie en microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) de cellules sanguines de mammifères dans un petit vaisseau sanguin. Les plus grosses à surface rugueuse sont des globules blancs. Les plus petites sont des globules rouges (tiré d'Alberts et al., 1994).

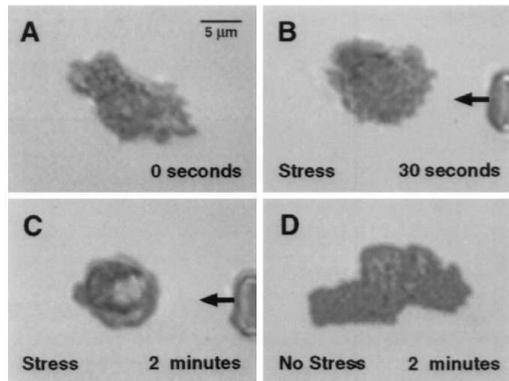


Figure 6_65 (gauche): Un neutrophile humain étalé initialement, rétracte ses pseudopodes dès l'application d'un flux en sortie d'une micropipette (contrainte d'environ 0.2 Pa). A l'arrêt du stress, la cellule s'étale à nouveau (tiré de Moazzam et al., 1997).

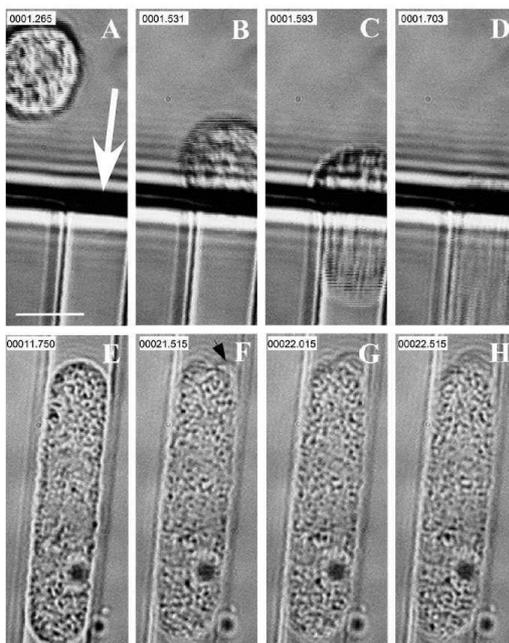
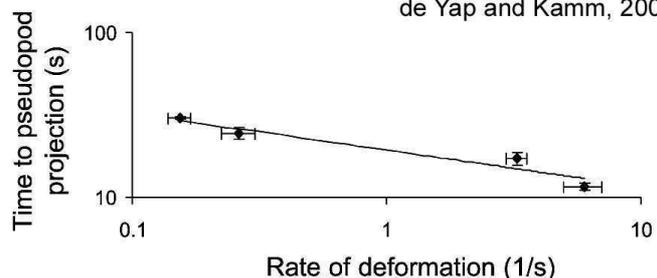


Figure 6_66 (gauche): Sous l'action d'un flux dans un microcanal (indiqué par la flèche blanche), un neutrophile est entraîné dans le canal. Il se déforme et finit par y rentrer complètement. Après un temps de latence, le neutrophile émet une protrusion (flèche noire). Statistiquement, la protrusion apparaît indifféremment d'un côté ou de l'autre du neutrophile (tiré de Yap and Kamm, 2005).

Figure 6_67 (bas): Effet du taux de déformation sur le temps écoulé avant l'émission d'un pseudopode par le neutrophile. Le taux de déformation est défini comme l'inverse du temps que met le leucocyte à entrer dans le capillaire. Plus ce taux est important, plus la cellule émet un pseudopode rapidement (tiré de Yap and Kamm, 2005).



La dépendance de l'étalement cellulaire avec la contrainte de cisaillement suggère donc que les leucocytes sont mécanosensibles. Les auteurs tentent d'expliquer l'apparente contradiction avec l'étude de Moazzam et al. (1997) en invoquant l'état initial des leucocytes qui est différent dans les deux études (cellules étalées versus cellules rondes) et suggèrent que la réponse cellulaire à la contrainte mécanique dépend des conditions initiales d'étalement cellulaire.

Yap and Kamm (2005) utilisent un autre dispositif expérimental pour stimuler mécaniquement des globules blancs. Pour mimer l'entrée et le mouvement d'un leucocyte dans un capillaire, qui force le leucocyte à se déformer, ils développent une chambre avec un micro-canal (dimensions typiques de 1,5 à 5 μm) et font passer un flux de liquide dans ce canal pour provoquer l'entrée de cellules situées dans un réservoir amont (Fig. 6_66). De plus, ils quantifient les propriétés rhéologiques des cellules à l'entrée dans le capillaire en mesurant le mouvement Brownien de granules intracellulaires. Ils observent ainsi que la déformation mécanique à l'entrée du capillaire provoque, en une dizaine de secondes, une décroissance significative des modules élastique et de perte (d'environ 40 et 55 % respectivement), cette réduction étant indépendante de l'amplitude de la stimulation mécanique. Les auteurs proposent que la déformation mécanique à l'entrée du capillaire provoque le réarrangement ou la destruction des points de réticulation du cytosquelette des neutrophiles. D'autre part, à la suite de l'entrée des leucocytes dans le capillaire, des pseudopodes sont formés, aléatoirement d'un côté ou de l'autre de la cellule qui migre dans la direction de cette première émission. Les auteurs montrent que le temps séparant l'entrée dans le capillaire et la projection du premier pseudopode décroît linéairement avec le taux de déformation (Fig. 6_67). Cette observation révèle que l'activation des leucocytes (visualisée par l'émission d'une protrusion) est plus rapide lorsque la stimulation mécanique est plus grande, suggérant l'existence d'un mécanisme de transduction du signal capable de moduler sa réponse en fonction de l'amplitude du stimulus mécanique. Au contraire, dans l'étude de Coughlin and Schmid-Schonbein (2004), le temps d'apparition d'un pseudopode en réponse au stimulus mécanique ne dépend pas de la contrainte de cisaillement.

Enfin, Rainger et al. (1999) ont étudié la migration de neutrophiles sous un flux de 0,05 Pa (et sous constante perfusion du chimioattractant N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)) sur une surface recouverte de plaquettes sanguines ou fonctionnalisée avec divers ligands de diverses protéines d'adhésion de ces leucocytes. Lorsque la surface est recouverte de plaquettes sanguines ou de P-sélectine avec de la CD31 ou seulement de CD31 (CD31, aussi appelée PECAM-1, est un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$), l'application du flux

provoque la migration d'une majorité de cellules avec le flux (85 +/- 12 % dans le cas d'une surface recouverte de plaquettes). A l'arrêt du flux, le mouvement est à nouveau aléatoire, avec les mêmes vitesses de migration. Par contre, un substrat recouvert uniquement de P-sélectine ne permet pas d'avoir une migration dirigée avec le flux. De plus, si les neutrophiles sont prétraités avec un anticorps contre l'intégrine α_v , alors la migration sous flux sur des plaquettes sanguines devient aléatoire avec des vitesses équivalentes au cas sans anticorps. Le blocage d'une autre intégrine (CD11a) n'a aucun effet. Enfin, sur des substrats recouverts uniquement de fibronectine (un autre ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$), la migration des leucocytes est dirigée par le flux alors qu'elle redevient aléatoire en rajoutant des anticorps contre l'intégrine β_3 ou l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il apparaît donc que les neutrophiles détectent l'application de forces mécaniques et la direction de ces forces à travers les liens que font les intégrines $\alpha_v\beta_3$ avec un de leurs ligands comme CD31 ou la fibronectine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ apparaît donc comme un capteur des forces mécaniques appliquées. Par contre, cette étude ne montre aucune dépendance avec la contrainte de cisaillement et ne permet donc pas de conclure quant à la capacité des leucocytes de mesurer les forces mécaniques appliquées.

En conclusion, ces études suggèrent dans les leucocytes l'existence de mécanismes menant à la détection et éventuellement la mesure de forces mécaniques extérieures. Cependant, certaines contradictions apparentes entre ces travaux et la complexité des phénotypes observés dépendant possiblement de l'état initial et donc de l'histoire des cellules sèment le doute et ne permettent pas de certifier l'existence de mécanosensibilité dans les globules blancs. D'autres études seront nécessaires pour comprendre la réponse des leucocytes à l'application de stimuli mécaniques et pour éventuellement unifier dans un même modèle des observations qui, aujourd'hui, semblent contradictoires.

6.9.6 Les fibroblastes

Les fibroblastes possèdent de nombreux mécanismes mécanosensibles.

En utilisant des substrats élastiques micro-structurés, Balaban et al. (2001) ont montré l'existence, dans des fibroblastes stationnaires, d'une relation linéaire entre la surface des adhésions focales et les forces locales exercées par les cellules sur le substrat en chacune de ces adhésions (Fig. 6_68). Les forces locales présentent une bonne corrélation non seulement avec l'aire des adhésions focales mais aussi avec leur orientation, et l'intensité totale de fluorescence de la GFP-vinculine en chaque adhésion. La pression exercée par ces cellules au niveau de chacune des régions d'adhésion avec le substrat est donc constante, de l'ordre de

5,5 +/- 2 nN. μm^{-2} . De plus, lorsque la contraction du système actine-myosine est inhibée, les forces exercées par les cellules et l'intensité du marquage fluorescent des adhésions focales commencent à décroître simultanément, dans un délai de l'ordre de la dizaine de secondes, et les décroissances sont proportionnelles. Ainsi, les forces exercées par les fibroblastes aux points focaux d'adhésion, via la contraction du complexe actine-myosine, déterminent l'assemblage de ces structures adhésives. De cette manière, les adhésions focales des fibroblastes permettent de mesurer de manière hautement dynamique l'ancrage des ligands à l'interface cellule-substrat, ainsi que la rigidité du substrat.

Riveline et al. (2001) ont montré, en cisillant la surface supérieure de fibroblastes avec une micropipette, que le système actine-myosine n'était pas nécessaire pour provoquer l'élongation d'adhésions focales et de complexes focaux en réponse à l'application d'une force mécanique (Fig. 6_69). Ils observent que cette élongation, qui nécessite un réseau d'actine intacte, est dirigée dans la direction des forces appliquées et qu'elle est associée au recrutement de la protéine GFP-vinculine. Ces résultats confortent l'idée que les sites d'adhésion riches en intégrines comme les complexes focaux et les adhésions focales sont des mécanosenseurs des forces exercées à l'interface cellule-substrat et que l'assemblage de ces structures est directement lié à ces forces. Il est à noter que ce renforcement des adhésions focales dû à l'application de forces extérieures n'est possible que si l'adhérence au substrat est suffisante.

Ce même type de renforcement des complexes liant intégrines et cytosquelette a déjà été observé par Choquet et al. (1997). Ces auteurs ont utilisé une pince optique pour appliquer des forces sur des billes attachées à la surface cellulaire via des intégrines. Ces billes sont naturellement transportées vers l'arrière des cellules (rearward transport) et peuvent ainsi s'échapper d'un piège optique fixe correspondant à des forces appliquées de 1 à 15 pN. A la suite de l'application de forces par un piège optique et de la libération d'une bille de ce piège, la bille reprend alors sa migration vers l'arrière de la cellule. Dans ces conditions, les auteurs mesurent la force minimale qu'il faut appliquer pour pouvoir à nouveau influencer sur le mouvement de la bille. Ils observent que cette force est proportionnelle et environ trois fois plus grande que la force du piège optique initial (Fig. 6_70). Ces expériences mettent en évidence un renforcement local des liens cytosquelette-intégrines en réaction à l'application de forces sur ces liens. Ce renforcement, spécifique aux liens contenant des intégrines, est d'autant plus grand que les forces appliquées sont grandes et s'effectue en moins de 10 secondes (Fig. 6_70_C).

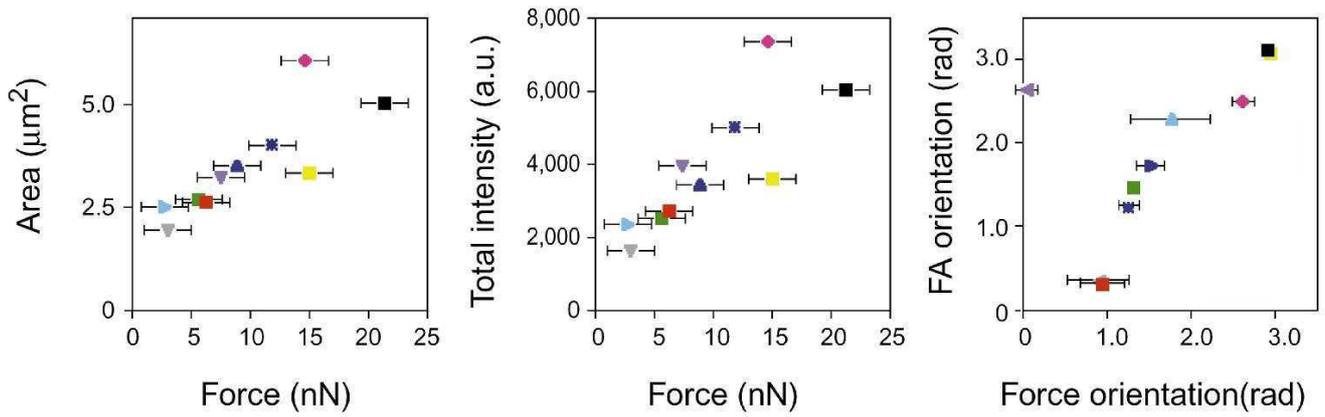


Figure 6_68 (haut): La pression exercée sur le substrat par des fibroblastes stationnaires est constante au niveau de chacune des régions d'adhésion. Les forces locales exercées par la cellule présentent une bonne corrélation avec l'orientation, l'intensité totale de fluorescence de la GFP-vinculine et l'aire des adhésions focales. Mesures effectuées sur des substrats élastiques de PDMS microstructurés avec répartition uniforme de plots fluorescents (Balaban et al., 2001).

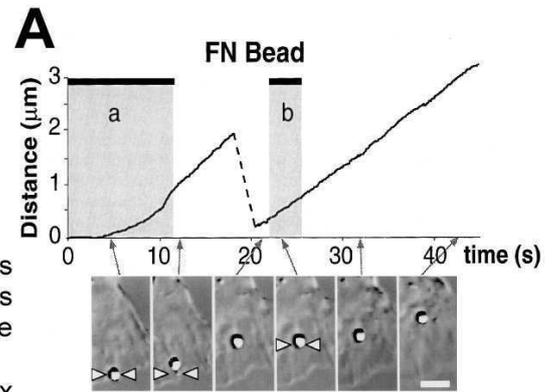


Figure 6_70 (droite): Renforcement des complexes adhésifs par l'application de forces.

A) Les deux premières photos montrent la bille qui s'échappe du piège optique (flèches). La bille continue son mouvement vers l'arrière de la cellule. A la quatrième photo, une force est à nouveau appliquée avec la pince optique (zone grisée) sur la bille mais cette dernière continue son mouvement sans être freinée par la force. La ligne pointillée indique le déplacement de la pince optique.

B) Plus la force appliquée initialement par la pince optique est grande (restraining force), plus la force nécessaire pour retenir à nouveau la bille est grande.

C) Le renforcement des liens adhésifs s'opère en moins de 10 secondes (Choquet et al., 1997).

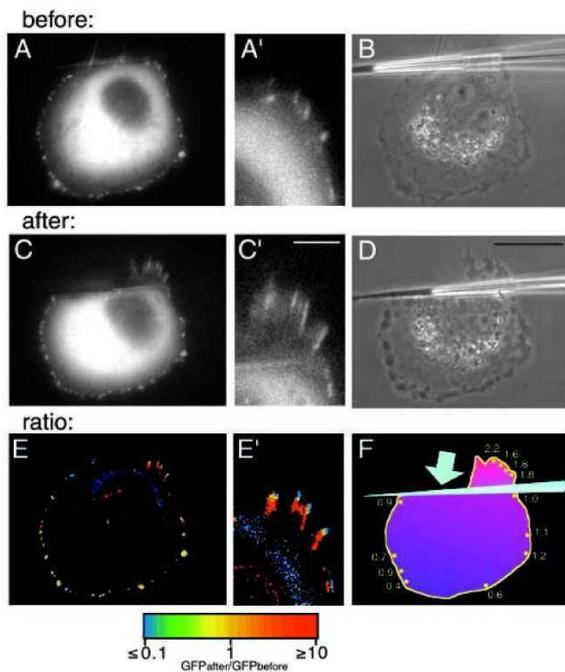
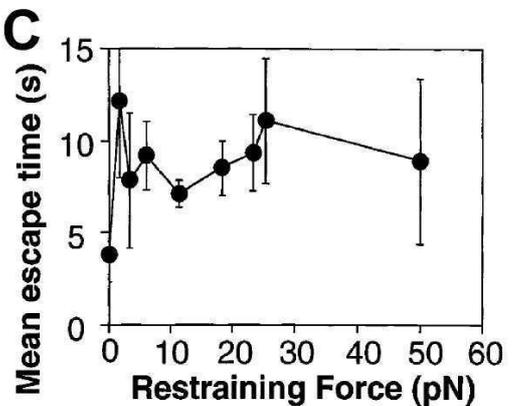
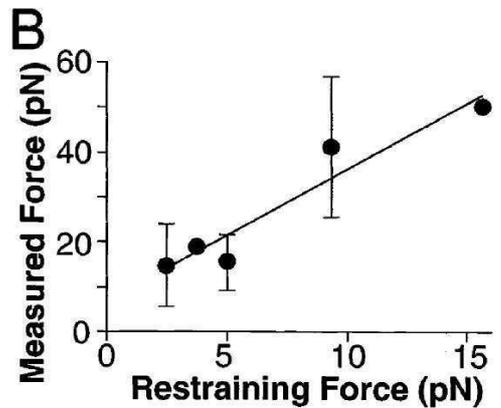


Figure 6_69 (haut): L'application sur des fibroblastes de forces mécaniques de cisaillement à l'aide d'une micropipette provoque l'élongation des complexes focaux et des adhésions focales. Cela confirme que ces régions d'adhésion au substrat se comportent comme des mécanosenseurs qui mesurent la direction et l'intensité des forces appliquées (Riveline et al., 2001).



Les fibroblastes possèdent également des canaux mécanosensibles (Stockbridge and French, 1988). En utilisant des billes magnétiques recouvertes de collagène qui se lient aux complexes protéiques contenant l'intégrine α_2 , de la taline, de la vinculine, Glogauer et al. (1995 ; 1997) appliquent des forces surfaciques de 2 N/m^2 et dont la direction est perpendiculaire à la surface supérieure des fibroblastes. En réponse à ces forces, ils observent le recrutement localisé d'actine filamenteuse (mais pas de taline, ni de vinculine) aux sites d'adhésion avec les billes (Fig. 6_71_A), un influx de calcium en quelques secondes (Fig. 6_71_B) et la tyrosine-phosphorylation de la paxilline (Fig. 6_71_D). De plus, la rigidité de la membrane augmente fortement aux alentours de la bille (Fig. 6_71_C). Enfin, les auteurs ont constaté que la réorganisation du réseau d'actine avec recrutement localisé de F-actine en réponse à l'application des forces nécessitait la tyrosine phosphorylation et l'influx de calcium. Le calcium est un régulateur connu des protéines se liant à l'actine et joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette (Janmey, 1994). Pour expliquer le processus de désensibilisation (absence ou réduction du nouvel influx de calcium après applications successives de forces ; Fig. 6_71_B), les auteurs proposent un modèle d'activation/désactivation des canaux. Dans ce modèle l'application de forces mécaniques extérieures conduit à l'activation de canaux mécanosensibles permettant l'entrée de calcium. Cette entrée de calcium provoque la réorganisation du réseau d'actine avec recrutement localisé de F-actine au site d'application des forces qui provoque une rigidification de la membrane entraînant la fermeture des canaux (Fig. 6_71_E). On a donc une boucle entre trois étapes : 1) entrée de calcium en réponse aux forces, 2) réorganisation du réseau d'actine dépendant du calcium, 3) régulation de l'influx de calcium par l'actine filamenteuse. Cette boucle permet de détecter les forces appliquées et permet à la cellule de se protéger contre de fortes tensions extérieures. On a donc là encore un mécanisme de renforcement, de résistance aux forces extérieures. Ce modèle est un exemple dans lequel structures du cytosquelette et canaux mécanosensibles interagissent dans le processus de mécanotransduction. Un aspect de cette étude n'est malgré tout pas totalement convaincant : les auteurs n'ont pas pu montrer de manière évidente le recrutement de F-actine au niveau des billes sur une échelle de temps de 1 à 6 minutes (Fig. 6_71_A) qui est pourtant l'échelle de temps sur laquelle a lieu le processus de désensibilisation (Fig. 6_71_B).

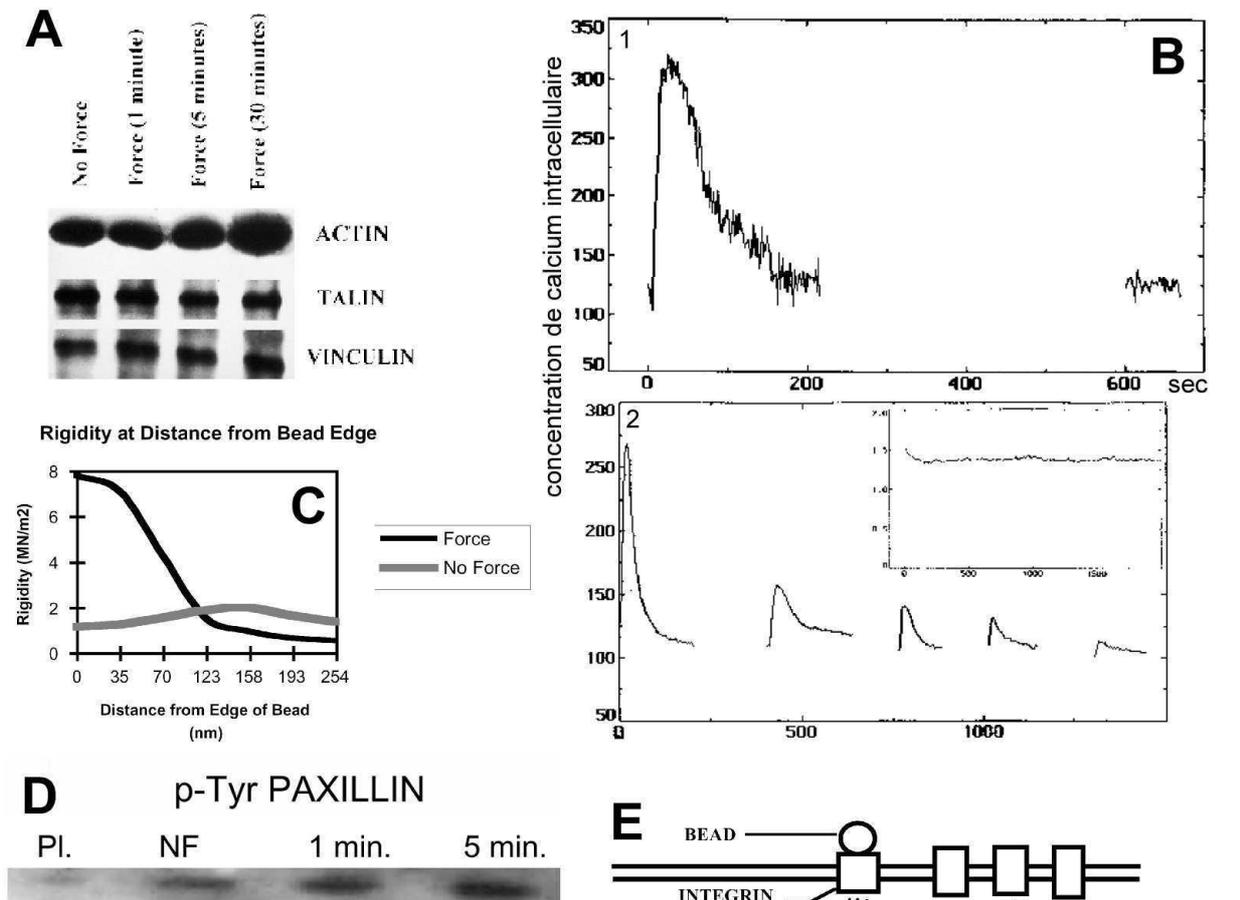
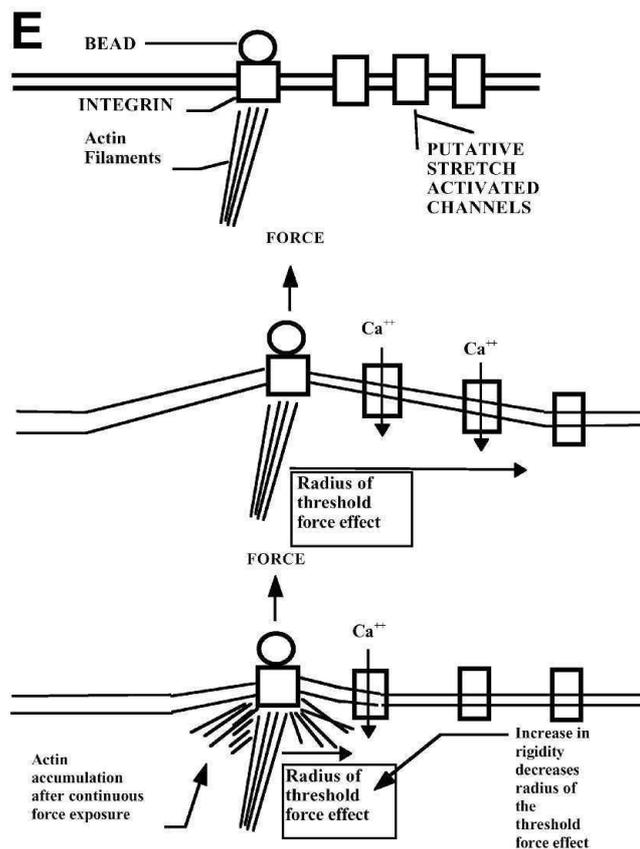


Figure 6_71: Les fibroblastes ont des canaux mécanosensibles. L'application, à l'aide de billes, de forces (2 Pa) perpendiculaires à la surface dorsale de fibroblastes provoque plusieurs réponses: **A**) un recrutement d'actine filamenteuse aux sites d'adhésion avec les billes, **B**) un influx de calcium en quelques secondes, **C**) un mécanisme de rigidification de la membrane aux alentours du site d'application des forces (bille) et **D**) la tyrosine phosphorylation de la paxilline. En **B**), il apparaît un mécanisme de désensibilisation. La première courbe correspond à l'application prolongée (10 min) de forces à $t = 0$. Lorsque de nouvelles forces sont appliquées pendant une seconde à $t = 600$ s, aucune influx de calcium n'est observé. La deuxième courbe correspond à l'application de forces de façon répétée toutes les 6 minutes et pendant 15 sec. On observe là encore un mécanisme de désensibilisation. En prenant en compte ces résultats, un modèle est proposé (**E**): l'application de forces sur la membrane provoque l'ouverture de canaux calciques. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire provoque la réorganisation du cytosquelette d'actine, un renforcement au site contraint et finalement la diminution du nombre de canaux activés (Glogauer et al., 1997).



Contrairement à la stimulation de cisaillement avec une micropipette (Riveline et al., 2001) qui engendrait le recrutement de GFP-vinculine aux sites d'adhésions focales, dans l'étude de Glogauer et al. (1997), seule l'actine est recrutée au site d'application de la force et

pas la vinculine. Cette différence peut s'expliquer par la direction des forces appliquées : forces tangentielles ou perpendiculaires à la membrane cellulaire. Cela montre la variabilité des réponses en fonction de la direction des forces appliquées relativement à la membrane cellulaire. Un autre exemple confirmant cette idée est celui de cellules du muscle lisse de l'aorte de rat qui, sous une contrainte uniaxiale d'étirement, expérimentent simultanément une activation de Rac des deux côtés de la cellule situés sur l'axe de la contrainte (forces appliquées perpendiculaires à la membrane) et une inhibition de Rac au niveau des deux autres quarts du contour cellulaire situés sur l'axe perpendiculaire (qui expérimentent l'application de forces tangentes à la membrane) (Katsumi et al., 2002).

De manière générale, il apparaît que les fibroblastes résistent aux forces extérieures appliquées en renforçant les sites d'adhésions focales qui sont des régions de transmission des forces exercées par la cellule sur le support (substrat, bille) ou réciproquement exercées par le support sur la cellule (principe d'action-réaction). On a donc un double jeu « détection des forces – résistance aux forces » au niveau des structures du cytosquelette.

6.9.7 La mécanosensibilité chez *Dictyostelium discoideum*

Plusieurs études ont cherché à quantifier la réponse de cellules *Dictyostelium discoideum* à l'application de contraintes de cisaillement. Il a été montré qu'un flux hydrodynamique laminaire stimule la motilité de ces cellules lorsqu'elles adhèrent à un substrat de verre. Elles migrent avec le flux avec des vitesses accrues par rapport au cas sans contrainte (Fig. 6_72 ; Décavé et al., 2003).

A la suite de ces travaux, Fache et al. (2005) ont analysé l'influence de la concentration de calcium extérieur sur la motilité de *Dictyostelium* induite par un flux. Ils ont observé que lorsque la concentration de calcium extérieur augmente de 5 μM à 1 mM, les cellules migrent beaucoup plus rapidement et ont prouvé que cet effet était lié à un influx de calcium extracellulaire et à l'utilisation de calcium relâché des stocks internes. Ces observations combinées au long temps de réponse des cellules à l'augmentation de la concentration de calcium suggèrent l'existence d'un mécanisme de relâchement de calcium des stocks internes induit par l'entrée de calcium extracellulaire (calcium-induced calcium release). De plus, les auteurs constatent que selon la contrainte de cisaillement appliquée, les cellules migrent soit avec le flux (pour des contraintes supérieures à 1 Pa), soit contre le flux (pour des contraintes inférieures à 0,7 Pa), soit 50 % d'entre elles avec et l'autre moitié contre le flux (pour des contraintes entre 0,7 et 1 Pa) (Fig. 6_73). Ce comportement prouve que les

cellules *Dictyostelium discoideum* sont capables de détecter la direction des forces appliquées ainsi que leur amplitude. Elles sont donc mécanosensibles et adaptent leur mouvement aux forces appliquées. De plus, le fait que le mouvement soit bi-directionnel entre 0,7 et 1 Pa montre que la directionnalité du mouvement individuel de chaque cellule (avec ou contre le flux) ne dépend pas que de la contrainte appliquée.

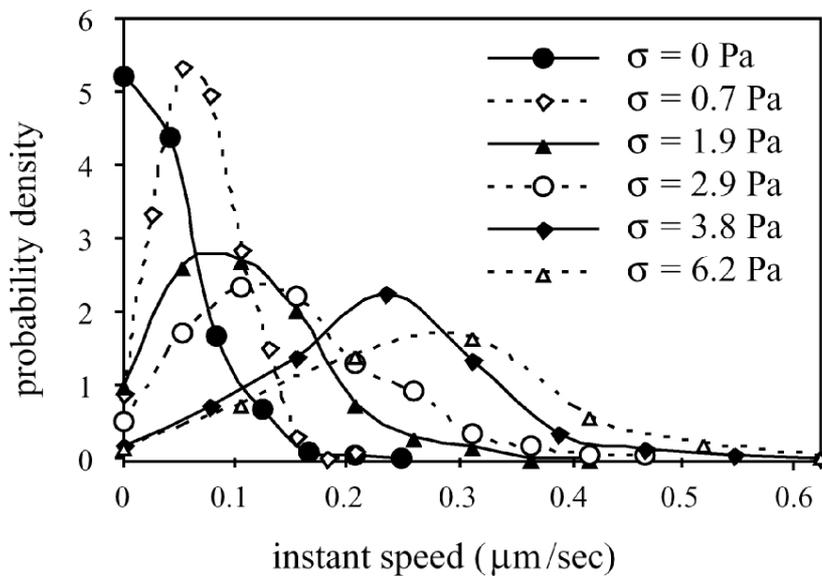


Figure 6_72: L'application d'un flux hydrodynamique sur des cellules *Dictyostelium* entraîne l'apparition de vitesses de migration accrues par rapport au cas sans contrainte (Décavé et al., 2003).

directionality

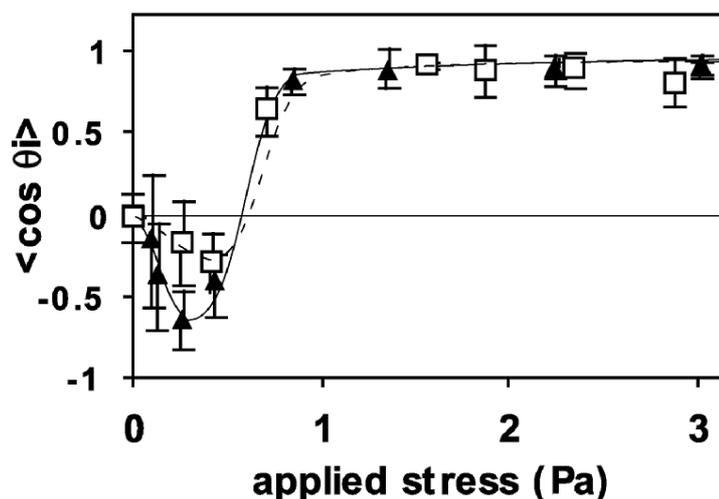


Figure 6_73: Les cellules *D. discoideum* se déplacent sous flux avec ou contre le flux, selon la contrainte de cisaillement (et d'autre(s) paramètre(s)). La directionnalité du mouvement est indiquée par la mesure de $\langle \cos \theta \rangle$. Lorsque sa valeur est positive, cela signifie que les cellules avancent avec le flux. Au contraire, si cette grandeur est négative, cela veut dire que les cellules migrent contre le flux. Ainsi, pour des contraintes inférieures à 0,7 Pa, les cellules migrent contre le flux. Pour des contraintes supérieures à 1 Pa, elles avancent avec le flux. Ces observations mettent en évidence que les cellules *Dictyostelium* mesurent l'intensité des forces appliquées (Fache et al., 2005).

Kuwayama et al. (1996) ont soumis des cellules *Dictyostelium discoideum* à un choc hyperosmotique. Ils observent une réponse cellulaire avec phosphorylation de la chaîne lourde de myosine-II via une augmentation de la concentration de cGMP intracellulaire. Cette phosphorylation permet une redistribution de la myosine-II qui s'accumule ensuite au niveau du cortex et donne un aspect arrondi à la cellule. Cette relocalisation fournit probablement un renforcement du cortex cellulaire de façon à résister au fort dégonflement. Ces expériences prouvent que *Dictyostelium* est capable de détecter l'application de pressions osmotiques et d'y répondre pour augmenter ses chances de survie. Cela est cohérent avec l'existence de mécanisme(s) mécanosensible(s) dans cette amibe.

6.9.8 Systèmes reconstitués

Un des moyens proposé pour vérifier le caractère mécanosensible d'un canal ionique consiste à effectuer des mesures par « patch-clamp » sur un morceau de membrane cellulaire ou dans un système reconstitué comme un liposome ou une bicouche lipidique. Ainsi, Hase et al. (1995) ont purifié le canal mécanosensible MscL d'*E.coli* et l'ont inséré dans un liposome. Les mesures de patch-clamp ont confirmé une activité mécanosensible, ce qui a permis aux auteurs de caractériser ce canal et de déterminer les conditions de son ouverture. Cependant, ce genre d'expériences sont très délicates et peuvent facilement conduire à l'observation d'artéfacts. Il convient donc d'être très prudent dans leur interprétation (Zhang and Hamill, 2000 b).

D'autres études ont porté sur l'effet de forces mécaniques sur des liposomes contenant des protéines G (Gudi et al., 1998) ou la phospholipase A₂ (Lehtonen and Kinnunen, 1995). Dans le premier cas, les auteurs montrent qu'un flux de cisaillement sur des liposomes contenant des protéines G suffit à stimuler leur activité GTPasique. Dans la deuxième étude, les auteurs indiquent que le gonflement osmotique de liposomes contenant la phospholipase A₂ suffit à engendrer son activité catalytique, selon un mécanisme dépendant de la densité surfacique des lipides. Les deux études montrent que l'activation de chaque protéine est modulée par la composition lipidique de la bicouche. Ces deux travaux mettent donc en évidence qu'une bicouche lipidique peut jouer le rôle d'un mécanorécepteur.

Dans des travaux très différents, des cytosquelettes insolubles dans un détergent, et qui ne sont donc plus entourés d'une membrane, ont été utilisés (Sawada and Sheetz, 2002; Tamada et al., 2004). Les auteurs observent la liaison et la dissociation de protéines spécifiques au niveau des contacts focaux en réponse à une stimulation mécanique. Ces

systèmes simplifiés de cellules permettent donc de prouver l'existence d'un mécanisme de détection de forces associé à la réorganisation directe du cytosquelette. Le cytosquelette (avec les contacts focaux) est donc capable de détecter des forces mécaniques, indépendamment de courants ioniques.

En conclusion, la mécanosensibilité a longtemps été considérée comme contrôlée uniquement par des canaux ioniques activés mécaniquement par la tension ou une déformation de la membrane plasmique. Aujourd'hui, il apparaît clair que les structures du cytosquelette, les complexes protéiques adhésifs, les canaux mécanosensibles et la membrane plasmique (indépendamment des canaux) communiquent et croisent leurs informations pour répondre de manière adaptée à une stimulation mécanique extérieure.

Malgré le boom des études sur la mécanosensibilité et la mécanotransduction depuis les années 1990, il reste encore beaucoup à comprendre dans les mécanismes moléculaires qui permettent de convertir un signal mécanique extracellulaire en signal biochimique intracellulaire. Par exemple, bien que les contacts focaux apparaissent être des mécanorécepteurs dans les fibroblastes, l'unité structurelle ou la protéine responsable de la détection des forces n'est pas encore identifiée, ni le mécanisme permettant la mesure des forces (dépliement de protéine, libération de sites de liaison, ... ?).

6.10 Objectif du travail de thèse

Nous avons vu que les cellules *Dictyostelium* sont sensibles aux forces hydrodynamiques et réagissent en migrant plus vite et en s'orientant avec le flux. Certains travaux dont ceux de Fache et al. (2005) ont utilisé des mutants null pour clarifier quelle signalisation était impliquée dans la réponse aux forces mécaniques. Cependant, la réorganisation du cytosquelette suite à l'application d'un stimulus mécanique n'a jamais été observée chez *Dictyostelium*. Le cytosquelette est pourtant l'un des acteurs principaux de la migration cellulaire et joue aussi un rôle important dans la perception de forces mécaniques dans divers types cellulaires.

Nos objectifs sont donc les suivants. D'abord observer le cytosquelette et son organisation en réponse à une contrainte mécanique constante. Puis, après avoir orientées les cellules par un flux de cisaillement de contrainte donnée et notre but est de forcer ces cellules à se réorienter en changeant subitement le sens du flux. Lors de ce processus de réorientation, un objectif est de déterminer qualitativement le comportement cellulaire (la cellule fait-elle un

U-turn, inverse-t-elle son côté avant et son côté arrière, arrête-t-elle de protruder ou au contraire, fait-elle des protrusions dans tous les sens, ...), et de visualiser la réorganisation du cytosquelette. Nous voulons aussi quantifier les cinétiques de relocalisation de protéines d'intérêt du cytosquelette d'actine. Ces objectifs atteints, nous devrions avoir un modèle de la réorientation cellulaire sous flux avec des informations quantitatives spatiales et temporelles concernant la redistribution de protéines du cytosquelette.

Dans un deuxième temps, notre objectif est de comprendre quelles structures cellulaires ou quelles protéines sont nécessaires à la mécanotransduction.

Enfin, il semble intéressant de comparer ce processus de réorientation cellulaire sous flux avec celui ayant lieu lors de l'inversion de la direction d'un gradient chimique (cas du chimiotactisme).

Pour pouvoir atteindre ces objectifs, nous avons ainsi développé une nouvelle chambre à flux permettant d'inverser rapidement la direction du flux, d'utiliser des lamelles et de faire des observations avec des objectifs à fort grossissement. Nous avons mis en place et organisé une collaboration avec le groupe de Günther Gerisch de l'institut Max-Planck de Martinsried qui est expert en imagerie de protéines de fusion fluorescentes dans des cellules vivantes et en microscopie confocale. En adaptant le programme d'analyses d'images de Dormann et al. (2002), nous avons pu caractérisé la réponse cellulaire à l'application de forces hydrodynamiques et quantifié la relocalisation de protéines lors de l'inversion de la direction du flux. En réalisant des expériences de chimiotactisme, nous avons pu comparer les processus de réorientation cellulaire sous flux ou dans un gradient chimique.

VII Matériels et Méthodes

7.1 Cultures cellulaires

Pour l'essentiel des expériences en chambre à flux, les cellules *D. discoideum* ont été utilisées en phase végétative, c'est-à-dire dans la phase unicellulaire. Cependant, pour quelques expériences sous flux et pour les expériences de chimiotactisme, les cellules ont été privées de nourriture (starvation) et ont été utilisées dans leur phase de développement où elles sont agrégation-compétentes.

7.1.1 Culture en milieu nutritif

Les cellules sauvages *Dictyostelium discoideum* vivent dans les sols de forêts tempérées dans les feuilles en décomposition. Elles se nourrissent alors de micro-organismes comme les levures et les bactéries.

Pour les besoins en laboratoire, des sélections successives ont été réalisées afin d'isoler une souche mutante capable de vivre dans un milieu nutritif liquide (Sussman and Sussman, 1967). Ce premier milieu nutritif de composition compliquée a été simplifié et sa simplification a été accompagnée de la sélection d'une nouvelle souche mutante, AX2, pouvant vivre dans ce milieu simplifié. C'est ce milieu que l'on utilise aujourd'hui dans les laboratoires, parfois à quelques variantes près (Watts and Ashworth, 1970). Ce milieu a pour composition :

- Oxoid bacteriological peptone (14.3 g)
- Oxoid yeast extract (7.15 g)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$ (1.28 g)
- KH_2PO_4 (0.486 g)
- D-glucose (15.4 g)

Le tout dilué dans un litre d'eau et dont le pH est ajusté à 6.7. Ce milieu assure aux cellules un apport riche en acides aminés, sucres et sels.

Dans ce milieu, la concentration cellulaire double en 8-9 heures (Fig. 7_1 ; Watts and Ashworth, 1970). Il est important que les cultures cellulaires soient maintenues à 22-23°C qui est la température optimale de croissance. Des températures en dessous de 20°C ou au-dessus de 25°C sont néfastes pour les cultures et peuvent éventuellement stopper la croissance et mener à la mort des cellules. Ces cultures cellulaires en milieu nutritif liquide sont appelées

axéniques car elles doivent être maintenues stériles. Dans ces cultures, les cellules se nourrissent par pinocytose, alors que les cellules sauvages ne se nourrissent que par phagocytose. Malgré tout, les cellules cultivées en culture axénique conservent leur capacité à phagocyter des particules solides et peuvent aussi être cultivées sur milieu solide recouvert de bactéries.

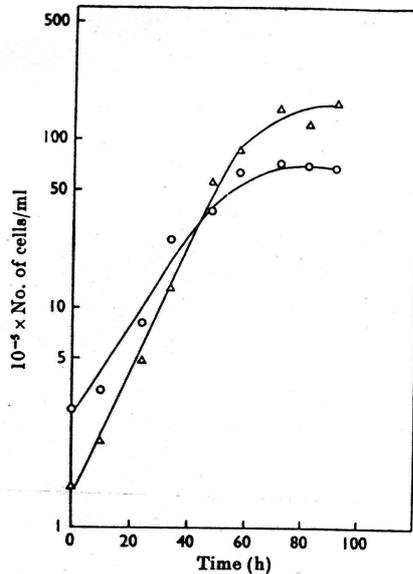


Figure 7_1: Cinétiques de croissance des cellules *Dictyostelium* AX2 dans un milieu avec (triangles) ou sans (cercles) glucose à 22°C et en culture agitée (tiré de Watts and Ashworth, 1970). La croissance est exponentielle pour des concentrations entre 5.10^5 et 5.10^6 cellules/mL.

Des variantes dans la composition du milieu peuvent apparaître selon les laboratoires qui utilisent l'organisme *Dictyostelium*. Ces différences semblent sans importance mais nous verrons que la composition de chaque milieu peut peut-être avoir des conséquences sur des phénotypes aussi complexes que sont l'adhérence et la motilité cellulaires. A Martinsried, à l'Institut Max-Planck de Biochimie, la composition exacte du milieu utilisé est la suivante :

- neutralized Oxoid bacteriological peptone¹ (14.3 g)
- Oxoid yeast extract² (7.15 g)
- Na₂HPO₄, 2 H₂O³ (0.616 g)
- KH₂PO₄⁴ (0.486 g)
- Maltose⁵ (18 g)

Le tout dilué dans un litre d'eau bidistillée et dont le pH est ajusté à 6.7 à l'aide d'une solution de soude⁶ de concentration 1 M. La solution diluée obtenue est ensuite autoclavée 20 minutes à 120°C. C'est cette solution que je noterai HL5 dans la suite. Aucun antibiotique n'est ajouté au milieu contrairement au milieu nutritif de Grenoble qui contient 0.25 g/L de dihydrostreptomycine.

¹ Neutralized bacteriological peptone : Oxoid, 500 g, réf. L34

² Yeast extract : Oxoid, 500 g, réf. L21

³ Na₂HPO₄, 2 H₂O : MERCK, réf. 1.06580.1000

⁴ KH₂PO₄ : MERCK, 1.04873.1000

⁵ Maltose : MERCK, réf. 1.05910.0500

⁶ Soude : MERCK, réf. 1.06498.1000

Les cultures axéniques peuvent être agitées ou non. Dans le cas de cultures en suspension, on utilise des erlenmeyers remplis entre 1/15^{ième} et 1/7^{ième} du volume total. Les erlenmeyers sont placés sur un agitateur giratoire⁷ et agités à 150 rpm (rotations par minute) afin d'oxygéner le milieu. Dans le cas de cultures non agitées, on utilise des boîtes de Pétri souvent de 10 cm de diamètre⁸. Dans ces cultures, on utilise 10mL de HL5 et les cellules adhèrent à la surface plastique du fond de la boîte. L'épaisseur du milieu nutritif liquide est de quelques millimètres, ce qui assure une bonne oxygénation des cellules aérobies.

Dans tous les types de cultures, il faut diluer régulièrement les cellules (en les resuspendant dans le cas de boîtes de Pétri) pour ne pas dépasser des concentrations de l'ordre de 4-5.10⁶ cellules/mL.

Les cultures en milieu nutritif doivent être limitées dans le temps : il est préférable de ne pas cultiver les cellules sur plus de quelques semaines (typiquement 2 à 3 semaines). En effet, il semble possible que des mutations spontanées ou d'autres types de sélections apparaissent au sein d'une culture ce qui rend la culture inhomogène. Ainsi, afin d'éviter tout risque et afin d'avoir des expériences les plus reproductibles possible, il est préférable de redémarrer une nouvelle culture cellulaire environ toutes les semaines ou deux semaines à partir d'un stock de cellules ou de spores congelés (voir la partie consacrée à la conservation des cellules).

7.1.2 Cellules en milieu non nutritif (starvation)

Pour certaines expériences sous flux et les expériences de chimiotactisme, il est nécessaire de priver les cellules de nourriture pour qu'elles commencent leur cycle de développement et deviennent agrégation-compétentes. Ce type de culture empêche la division cellulaire et ne permet donc pas de conserver les cellules. Ces cultures sont juste utilisées dans la journée.

Dans ce cas, les cellules sont prélevées soit d'une culture axénique agitée (de 30 mL) soit d'une culture axénique sur boîte de Pétri (de 10mL).

- La culture utilisée fait l'objet d'un comptage. L'idéal est d'avoir une culture à environ 3.10⁶ cellules/mL (c'est-à-dire en phase exponentielle de croissance ; voir Figure 7_1). A partir de trois boîtes de Pétri ou d'une flasque agitée à cette concentration, on récupère donc environ 9.10⁷ cellules.

⁷ Lab-Shaker, Adolf Kühner AG, SCHWEIZ

⁸ Falcon 10 cm / 100x20 mm polystyrène (réf. 35 3003)

- Les 30 mL sont centrifugés⁹ entre 400 et 600 g, pendant 5 minutes à faible température (environ 4°C).
- Puis resuspendre avec 30 mL de tampon phosphate Sørensen^{10,11} glacé. La resuspension avec une pipette doit être délicate pour éviter la formation de bulles.
- Le cycle centrifugation/resuspension dans PB est répété une deuxième fois
- Puis les cellules sont à nouveau comptées
- Elles sont resuspendues à une concentration de 1.10^7 cellules/mL dans du PB glacé et la solution est agitée dans une flasque de 25-30 mL (150 rpm). Ce moment est appelé t_0 , c'est le début de la période de carence.
- Les cellules sont normalement agrégation-compétentes entre $t_0 + 4-5$ h (pour des cellules AX2) et $t_0 + 8-9$ h. Cela dépend un peu de chaque souche cellulaire, les souches mutantes (KO ou exprimant des protéines de fusion) mettant souvent un peu plus de temps pour être bien allongées, bien agrégation-compétentes et sensibles à un gradient d'AMPc (attendre $t_0 + 7-8$ h). Dans certains cas (par exemple, pour les cellules HS1 doublement marquées, voir tableau 7_1), il est nécessaire de pulser les cellules avec du cAMP. Dans ce cas, les cellules sont d'abord carencées 2h en PB, puis, à l'aide d'un pousse-seringue, des gouttes de cAMP sont introduites dans la culture de façon à avoir une concentration finale en cAMP dans la fiole de 5.10^{-5} M.

7.2 Souches cellulaires utilisées

Le tableau suivant (tableau 7_1) fait l'inventaire des souches cellulaires utilisées en indiquant pour chacune le nom, la provenance, la souche parentale, la description de la souche, le mode de culture et l'éventuel ajout de produits nécessaires à la croissance ou à la pression de sélection dans le HL5, une ou plusieurs références.

Nom de la souche cellulaire	Provenance	Souche parentale	Description de la souche	Mode de culture et éventuel ajout de produits dans le HL5	Référence
JH10	Hans Warrick	JH8 (parent) et KAX-3 (de Jeff Hadwiger,	Cellules « sauvages » qui ne fabriquent pas de thymidine	Boîte de Pétri (10mL HL5) + thymidine ¹² à 100 µg/mL	Hadwiger and Firtel, 1992

⁹ Centrifugeuse Universal 16R Hettich Zentrifugen (rotor Hettich 1617, RPM5000)

¹⁰ Composition du tampon phosphate Sørensen : 9,985 g de KH_2PO_4 et 1,78 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pour 5L d'eau bidistillée (pH 6,0 ; autoclave 120°C pendant 20 minutes)

¹¹ Abréviation : PB pour « tampon phosphate Sørensen »

¹² Thymidine : Sigma-Aldrich (réf. T1895-1G), stocks à 10 mg/mL, stérilisés, conservés à -20°C

		grand-parent)			
HS1	Hans Warrick	JH10	Myo-II-null	Boîte de Pétri (10mL HL5)	Ruppel et al., 1994
HS1 + GFP-myo-II	Günther Gerisch's lab	HS1	Myo-II-null + GFP-myo-II	Boîte de Pétri (10mL HL5) + 5-10 µg/mL de généticine ¹³	Moore et al., 1996
HS1 + GFP-myo-II + mRFP-Lim-ΔCC	J'ai effectué la transformation dans le laboratoire de Günther Gerisch	HS1	Myo-II-null + GFP-myo-II + mRFP-M-Lim-ΔCC	Boîte de Pétri (10mL HL5) + 5-10 µg/mL de généticine + 10 µg/mL de blasticidine ¹⁴	Dalous et al., en préparation
JH10 + Lim-ΔCC-GFP	J'ai effectué la transformation dans le laboratoire de Günther Gerisch	JH10	Cellules « sauvages » qui ne fabriquent pas de thymidine, marquées avec Lim- ΔCC-GFP	Boîte de Pétri (10mL HL5) + thymidine à 100 µg/mL + 20 µg/mL de généticine	Dalous et al., en préparation
HS1 + Lim-ΔCC-GFP	Günther Gerisch's lab	HS1	Myo-II-null + Lim- ΔCC-GFP	Boîte de Pétri (10mL HL5) + 20 µg/mL de généticine	Diez et al., 2005 ; Dalous et al., en préparation
AX2-214	Günther Gerisch's lab	AX2 d'Ashworth	Cellules « sauvages » reclonees par Günther Gerisch	Boîte de Pétri (10mL HL5)	Gerisch et al., 1995
HG1668 (AX2 + GFP-α-tubuline)	Günther Gerisch's lab	AX2-214	Cellules « sauvages » avec microtubules et centrosome marqués par GFP-α-tubuline	Boîte de Pétri (10mL HL5) + 20 µg/mL de généticine	Neujahr et al., 1998
AX2 Grenoble Clone C1/3	Günther Gerisch's lab	AX2-214	Cellules « sauvages »	Boîte de Pétri (10mL HL5) ou culture agitée	Décavé et al., 2003
NC4a	Günther Gerisch's lab	NC4	Cellules « sauvages »	Substrat d'agar recouvert de bactéries	Morrison and Harwood, 1992; Sheldon and Knecht, 1995

Tableau 7_1: Ensemble des souches cellulaires utilisées pendant mon travail de thèse.

¹³ Généticine : SIGMA , réf. A1720-1G, dilué dans PB, stocks à 20 mg/mL, stériles, conservés à -20°C

¹⁴ Blasticidine : FLUKA Biochemika (réf. 15205-100mg), dilué dans PB, stocks à 10 mg/mL, stériles, conservés à -20°C

7.3 Conservation des souches cellulaires

Comme nous l'avons souligné plus haut, il est préférable de travailler avec des cellules étant cultivées sur des périodes de temps de deux semaines maximum. Cela est d'autant plus vrai que les phénotypes observés sont complexes et font intervenir diverses propriétés cellulaires intégrées dans un processus global (propriétés d'adhésion, de polymérisation de l'actine, ... lors de la motilité sous flux par exemple).

Afin de conserver une souche cellulaire homogène qui soit toujours la même sur de longues périodes d'expérimentation (typiquement 40 ans), il faut donc générer un stock de spores (si possible) ou de cellules que l'on congèle et à partir duquel une nouvelle culture est démarrée à intervalles de temps réguliers (typiquement une à deux semaines).

Protocole de congélation de cellules

1) Préparer une solution pour congélation dont la composition est :

- 9,4 mL de milieu HL5
- 100 μ L de solution Pénicilline/Streptomycine^{15,16}
- 500 μ L de DMSO¹⁷

Si l'expérimentateur craint une éventuelle contamination de cette solution, il peut la filtrer¹⁸.

2) Vortexer le mélange et placer cette solution dans un bac à glace.

3) Resuspendre les cellules de trois boîtes de Pétri de 10 mL ou récupérer les cellules d'une solution agitée de 30 mL. Les cellules doivent être en phase exponentielle de croissance (entre 2 et $4 \cdot 10^6$ cellules/mL).

4) Centrifuger les 30 mL de cellules dans le HL5 (entre 400 et 600 g, 5 minutes, 4°C).

5) Retirer le surnageant (milieu HL5) délicatement pour ne pas perdre de cellules du culot.

6) Resuspendre délicatement le culot dans 5 mL de la solution de congélation (éviter les bulles).

7) Placer chacun des 5 mL du mélange concentré de cellules dans 5 tubes de congélation¹⁹ de 1.5 ou 2 mL.

8) Placer les tubes de congélation immédiatement dans la glace.

¹⁵ Solution de Pénicilline/Streptomycine : GIBCO, Invitrogen Corp., 100 mL, Cat. N°15140-122

¹⁶ Abréviation : Pen/Strep pour « solution de Pénicilline/Streptomycine »

¹⁷ DMSO : CALBIOCHEM 500 mL Cat # 317275

¹⁸ Filtres Millipore Sterile Millex Filter Unit 0,22 μ m / 33mm, membrane MF, réf. SLGS033SS

¹⁹ tubes de congélation Greiner Bio-one, Cellstar

9) Puis placer les tubes sur un cannister (freezing tray) pour tank de nitrogène liquide (laisser une heure au niveau haut, 2 heures à un niveau intermédiaire et 3 heures au niveau inférieur), de manière à appliquer une rampe de température pas trop élevée.

10) Transférer les tubes congelés dans un congélateur à -80°C ou idéalement dans un tank d'azote liquide (-196°C).

Le point important durant la congélation de cellules est de conserver au maximum les cellules dans la glace et de s'assurer d'avoir un environnement stérile.

Protocole de fabrication et de congélation de spores

Dans le cas de souches cellulaires avec un développement aboutissant à la formation de spores, il est plus pratique et plus efficace de congeler des spores au lieu de cellules.

1) Resuspendre les cellules de trois boîtes de Pétri de 10 mL ou récupérer les cellules d'une solution agitée de 30 mL. Les cellules doivent être en phase exponentielle de croissance (entre 2 et $4 \cdot 10^6$ cellules/mL).

2) Centrifuger les 30 mL de cellules dans le HL5 (entre 400 et 600 g, 5 minutes, 4°C).

3) Retirer délicatement le surnageant.

4) Resuspendre le culot avec 30 mL de PB glacé.

5) Centrifuger les 30 mL de cellules dans le PB (entre 400 et 600 g, 5 minutes, 5°C).

6) Retirer délicatement le PB.

7) Resuspendre le culot avec 1 mL de PB.

8) Déposer et étaler la solution concentrée de cellules sur une boîte de phosphate-agar²⁰.

9) Laisser sécher et renverser la boîte de façon à ce que les corps fructifères poussent vers le bas, avec la tige au-dessus.

10) Placer la boîte dans un environnement humide (typiquement dans une grosse boîte contenant la boîte d'agar et un papier mouillé dans un coin).

11) Attendre typiquement entre un et deux jours.

12) Si la surface d'agar est recouverte de spores, prendre 5 mL de PB stérile et resuspendre délicatement les spores.

13) Placer chaque mL de spores resuspendues dans 5 tubes de congélation de 1.5 ou 2 mL.

²⁰ phosphate-agar : 60 g d'Agar-Agar (Biomatik GmbH, Typ BRC-RG, Bestell-Nr 23160) dans 5L de PB (autoclave 120°C , 60 min)

14) Congeler directement les tubes dans du nitrogène liquide et les conserver dans un congélateur à -80°C ou idéalement dans un tank d'azote liquide (-196°C).

Là encore, tous les milieux utilisés doivent être stériles et il faut prendre soin à ne pas contaminer les tubes de congélation pendant leur manipulation.

Protocole de décongélation de cellules

1) Dès que les tubes de congélation sont sortis du tank de nitrogène liquide ou du congélateur, les placer dans un bac à glace pendant quelques minutes.

2) Laisser les tubes décongeler hors du bac et dès qu'il y a une couche de liquide interne, placer le contenu du tube dans 10 ou 30 mL de HL5 glacé stérile (ne pas attendre que tout le volume soit décongelé).

3) Centrifuger les 30 mL de cellules dans le HL5 (entre 400 et 600 g, 5 minutes, 4°C).

4) Retirer le surnageant (qui contient le DMSO utilisé lors de la congélation).

5) Resuspendre le culot avec 10 mL de HL5 stérile à température ambiante et placer dans une boîte de Pétri (ne pas placer directement dans une culture agitée).

6) Laisser les cellules récupérer pendant 24 heures.

7) Après ces 24 heures, mettre la sélection correspondant à la souche cellulaire.

Protocole de décongélation de spores

1) Dès que les tubes de congélation sont sortis du tank d'azote liquide ou du congélateur, les placer dans un bac à glace pendant quelques minutes.

2) Laisser les tubes décongeler hors du bac et dès qu'il y a une couche de liquide dans le tube (ne pas attendre que tout le volume soit décongelé), prélever entre 30 et 50 μL de spores et les injecter dans 10 mL de HL5 dans une boîte de Pétri ou directement dans une culture agitée.

3) Remettre rapidement le tube de spores dans le bac à glace et replacer dans l'azote liquide ou le congélateur.

4) Mettre la sélection 24 heures plus tard.

7.4 Transformation des cellules : fabrication de souches mutantes

7.4.1 L'électroporation

La méthode choisie pour transformer les cellules est l'électroporation. Cette méthode consiste en l'application de champs électriques pulsés brefs et intenses (typiquement 1000 V, 0Ω , $3 \mu\text{F}$, $\tau = 0.8 \text{ ms}$) qui provoquent l'ouverture transitoire de la membrane plasmique, permettant ainsi l'introduction dans la cellule de molécules d'ADN étranger sous forme de plasmides. La membrane plasmique peut ensuite se refermer. L'ADN plasmidique contient des gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques, ce qui permet la sélection des cellules transformées qui expriment normalement le plasmide.

7.4.2 Amplification de vecteur (ou de plasmide)

Je n'aborderai pas ici la fabrication ab initio d'un plasmide comportant un gène d'intérêt (par exemple un gène codant pour la fusion d'une protéine du cytosquelette qui est présente chez *Dictyostelium* avec la GFP²¹), ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique, mais j'énoncerai juste le protocole d'amplification d'un vecteur à partir de quelques μL de ce vecteur.

Pour amplifier un plasmide, c'est-à-dire pour obtenir de nombreuses copies de ce plasmide à partir de peu de copies, nous utilisons des bactéries qui, à partir du moment où elles l'ont intégré, produisent ce plasmide en grosses quantités du fait de leur rapide cycle de division cellulaire (environ 20 minutes pour doubler la concentration de bactéries). Une première étape consiste donc à introduire le plasmide dans les bactéries. Une deuxième étape correspond à la sélection d'un clone de bactéries dont on est sûr qu'il a intégré le plasmide. Puis ce clone est mis en culture pour obtenir un grand nombre de bactéries contenant le plasmide. Enfin, une quatrième étape permet de récupérer le plasmide à partir de la solution de bactéries.

Ce travail peut s'effectuer sur la paillasse dans des conditions non stériles.

Intégration du plasmide dans les bactéries

- Dans un tube Eppendorf, placer :
 - 1 μL du plasmide que l'on souhaite amplifier
 - 100 μL de tampon TCM ²²
 - 100 μL de bactéries compétentes (*E. coli* JM 109 ²³)

²¹ Abréviation : GFP pour Green Fluorescent Protein

²² Tampon TCM : 10mM TRIS, pH7.5, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂

le tout dans un bac à glace.

- Pipeter up and down pour mélanger délicatement.
- Laisser 30 minutes dans la glace.
- Placer le tube à 42°C pendant 90 secondes (choc thermique).
- Remettre le tube dans le bac à glace et ajouter 1 mL de milieu LB²⁴, mélanger.
- Placer le tube à 37°C pendant 30 minutes.

Sélection d'un clone de bactéries contenant le plasmide

- Centrifuger à 1500 g²⁵ pendant environ 20 secondes (un culot doit clairement apparaître).
- Retirer et jeter 500 µL de surnageant.
- Re-mélanger le culot avec le surnageant restant en pipetant.
- Etaler avec un râteau stérile 50, 100 et 400 µL de ce mélange sur 3 boîtes de gel LB-Amp.²⁶ sous hotte stérile. L'ampicilline sert à sélectionner les bactéries qui ont intégré le plasmide qui leur confère la résistance à cet antibiotique.
- Laisser les trois gels sécher légèrement et les placer en incubation à 37°C toute la nuit, en les retournant (gel en haut de la boîte).
- Le lendemain matin, vérifier que des clones sont apparus à la surface des gels, avec un nombre proportionnel à la quantité de solution de bactéries étalée. Si c'est le cas, placer les 3 gels au frigidaire à 4°C.

Mise en culture d'un clone de bactéries ayant intégré le plasmide

- Dans l'après-midi, préparer, sous hotte stérile, une flasque stérile de volume total 500 mL ou 1 L en la remplissant de 200 mL de LB-Amp. stérile.
- Se désinfecter les mains et piquer à l'aide d'un cure-dent stérile un clone sur un des trois gels (choisir un gel avec des clones bien espacés de façon à s'assurer que l'on ne pique qu'un seul clone) et laisser tomber le cure-dent dans la flasque.
- Placer la flasque sur un agitateur giratoire à 220 tr/min à 37°C toute la nuit.

²³ Cellules JM109 : voir Yanisch-Perron et al., 1985

²⁴ Milieu LB : 50 g de Bacto-Tryptone (de Difco), 25 g de yeast extract (Oxoid) et 25 g de NaCl, le tout dans 5 L d'eau

²⁵ Correspond à 5000 rpm sur une centrifugeuse du type Eppendorf centrifuge 5415C avec rotor Eppendorf F-45-18-11 5402 (5cm de rayon).

²⁶ Amp. pour Ampicilline : Sigma, réf. A-9518. Dans le LB-Amp., la concentration de l'ampicilline est de 100 µg/mL.

Récupération du plasmide à partir de la solution de bactéries

Cette étape est très standardisée et correspond au protocole « Plasmid DNA purification using QIAGEN plasmid maxi kits »²⁷.

A la fin de cette procédure, on récupère une solution de plasmide typiquement de 500 µL de concentration 1 µg/µL. La mesure de cette concentration et la vérification de la qualité de l'ADN récupéré se font à l'aide d'un spectrophotomètre²⁸.

7.4.3 Protocole de transformation par électroporation

Tout le protocole doit être exécuté sous hotte stérile avec des solutions stériles.

- Utiliser des cellules en phase exponentielle de croissance à $2-3 \cdot 10^6$ cellules/mL. On prendra soit une flasque de 30 mL, soit 3 boîtes de Pétri de 10 mL chacune. Resuspendre les cellules et les laisser refroidir lentement dans un bac à glace pendant environ 10 minutes (cette étape de refroidissement n'est pas indispensable).
- Centrifuger les 30 mL contenant les cellules à environ 600 g pendant 5 minutes à 4°C.
- Jeter délicatement le surnageant et laver les cellules avec du PB à 4°C (gardé dans un bac à glace).
- Centrifuger (idem).
- Laver le culot de cellules avec 30 mL de tampon d'électroporation²⁹ à 4°C (conservé dans le bac à glace).
- Centrifuger (idem).
- Resuspendre délicatement les cellules dans quelques mL de EB de manière à avoir une concentration cellulaire comprise entre 3 et $10 \cdot 10^7$ cellules/mL. Placer les cellules dans le bac à glace.
- Dans une cuvette d'électroporation de 800 µL³⁰, placer l'ADN plasmidique de façon à avoir 15 à 30 µg de plasmide pour $5 \cdot 10^7$ cellules (typiquement 30 µL de la solution de plasmide). Compléter avec la solution de cellules jusqu'aux 800 µL que peut contenir la cuvette (éviter les bulles). Pipeter up and down pour mélanger délicatement le plasmide avec les cellules.

²⁷ QIAGEN Plasmid Maxikit Cat n° 12162

²⁸ Spectrophotomètre : Pharmacia, modèle Ultrospec III

²⁹ Tampon d'électroporation (abréviation : EB) : faire deux solutions : 1) 100 mM de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 9,2-9,4) et 2) 100 mM KH_2PO_4 (pH 4,3-4,5). Ajuster le pH de la solution de KH_2PO_4 avec la solution de K_2HPO_4 de manière à obtenir un pH de 6,1 (c'est le tampon KP). Pour faire 500 mL de tampon d'électroporation : ajouter 8,56 g de sucrose à 50 mL du tampon KP (pH 6,1) et compléter jusqu'à 500 mL avec de l'eau nanopure. Stériliser la solution en filtrant et aliquoter dans des Falcon tubes de 50 mL que l'on conserve à -20°C.

³⁰ cuvette d'électroporation Thermo Electron Cooperation, EPECU204, 4mm width

- Remplacer les cellules restantes non utilisées dans le bac à glace.
- Placer la cuvette quelques minutes dans le bac à glace.
- Placer la cuvette dans l'appareil d'électroporation³¹ et électroporer en utilisant les paramètres suivants : 1000 V, 3 μ F, 0 Ω . Le temps τ , correspondant à la durée de l'impulsion, est typiquement compris entre 0.4 et 0.9 ms.
- Remplacer la cuvette quelques minutes dans le bac à glace.
- Puis transférer délicatement les cellules électroporées dans un puit d'une plaque 24 puits³² ou sur une boîte de Pétri.
- Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.
- Ensuite, ajouter dans le puit 8 μ L d'une solution stérile à 0.1 M de CaCl_2 et 0.1 M de MgCl_2 (de manière à avoir 1 mM d'ions Ca^{2+} et d'ions Mg^{2+}).
- Incuber pendant 15 minutes à température ambiante (23°C) en agitant doucement (50 à 90 tr/min).
- Transférer la solution de cellules dans du milieu axénique (HL5 stérile) : typiquement placer 200 μ L dans une boîte de Pétri de 10 mL (ce qui donnera 4 boîtes de Pétri que l'on numérottera) et laisser les cellules récupérer pendant 24 heures.
- 24 heures plus tard, commencer la sélection à l'aide de l'antibiotique auquel le plasmide confère une résistance aux cellules.
- Un contrôle doit être effectué pour s'assurer que la résistance à l'antibiotique des cellules transformées provient bien de l'intégration du plasmide désiré. Les cellules restantes non utilisées sont donc elles aussi électroporées mais sans introduire de plasmide dans la cuvette d'électroporation. Ces cellules sont ensuite traitées de manière identique et laissées au repos pendant 24 heures. L'antibiotique, qui est rajouté au même moment dans les 4 boîtes de Pétri de cellules électroporées avec plasmide et dans la boîte de Pétri de cellules contrôle, doit provoquer la mort de toutes les cellules dans la boîte de contrôle alors que les 4 autres boîtes vont (espérons) montrer des clones de cellules résistantes après quelques jours.
- Laisser les cellules pousser. Des clones doivent apparaître quelques jours plus tard. Changer le milieu tous les 2 jours pour évacuer les cellules mortes.

³¹ BIO-RAD Gene Pulser

³² Plaque 24 puits Costar 3524

7.4.4 Protocole de clonage de cellules *Dictyostelium* mutées

Lorsque l'on obtient suffisamment de cellules transformées dans les boîtes de Pétri provenant de l'électroporation, il faut alors cloner les cellules. Ceci se fait en étalant les cellules de boîtes axéniques sur des boîtes de gel SM³³ en les mélangeant à des bactéries. Cette opération a pour but d'obtenir des clones de cellules ayant poussé à partir d'une cellule unique et qui se divisent en se nourrissant des bactéries. On pourra ainsi prélever les clones sem-indépendants et indépendants pour tester leurs propriétés. Par exemple, dans le cas d'une transformation visant à introduire une protéine de fusion contenant la GFP ou la mRFP, on testera la fluorescence de chaque clone ainsi que la localisation attendue de la protéine de fusion si celle-ci est déjà connue.

Remarque : Pour éviter d'étaler des cellules sans intérêt (par exemple sans fluorescence), vérifier la fluorescence « globale » d'une boîte en prélevant des cellules au hasard dans chaque boîte obtenue après électroporation.

Voici donc le protocole de clonage. Toutes ces opérations sont effectuées sous hotte stérile.

- Prélever une bonne noix de bactéries B/2³⁴ à partir d'une boîte conservée au frigidaire, à l'aide d'un anneau métallique stérilisé par la flamme.
- Placer cette noix de bactéries dans environ 5 mL de PB stérile.
- Vortexer les bactéries afin d'obtenir une solution homogène.
- Déposer entre 100 et 200 µL de cette solution de bactéries sur chacune de 3 boîtes de gel SM.
- Resuspendre les cellules transformées d'une boîte de Pétri provenant de l'électroporation ayant donné des clones au bout de quelques jours.
- Déposer environ 30 à 60 µL de cette culture (avec du HL5) sur la première boîte de gel SM uniquement.
- Mélanger les cellules *Dictyostelium* avec les bactéries sur la boîte de gel SM et étaler à l'aide d'un râteau stérile.
- Avec le même râteau (qui contient encore des cellules *Dictyostelium* sur sa surface), étaler les bactéries sur les deux autres boîtes de gel SM (numéroter les boîtes).

³³ Boîte de gel SM : 24 g agar (compagnie IMA), 20 g bacteriological peptone (Oxoid), 20 g glucose, 2 g yeast extract (Oxoid), 2 g MgSO₄·7H₂O, 4,4 g KH₂PO₄, 2,6 g K₂HPO₄·3H₂O, le tout dilué dans 2 L d'eau, pH 6,4-6,5

³⁴ Bactéries B/2 : voir Williams, 1978

- Laisser sécher les boîtes et les renverser.
- Les garder à température ambiante et surveiller les jours suivants l'apparition de clones.
- Deux ou trois jours plus tard, lorsque des clones apparaissent, prélever des cellules en piquant chaque clone à l'aide d'un cure-dent stérile et tremper chaque cure-dent dans un puit d'une plaque de 24 puits rempli chacun d'un mL de milieu axénique (HL5) avec l'antibiotique approprié et 100 µL de solution Pen/Strep pour 10 mL de milieu (pour tuer les bactéries). Les clones doivent être bien circulaires. Un clone ayant une forme ellipsoïdale est probablement la rencontre de deux clones et ne doit donc pas être prélevé.
- Lorsque, quelques jours plus tard, des puits ont suffisamment de cellules, vérifier la fluorescence de chaque clone (dans le cas d'une transformation pour rendre une protéine fluorescente) ou faire le test approprié pour vérifier l'apparition du phénotype voulu.
- Choisir les meilleurs clones. Pour chacun de ces clones, lorsque l'on a assez de cellules, les resuspendre dans le puit correspondant et les transférer dans une boîte Pétri avec le même milieu (HL5 complété du ou des antibiotiques et 100 µL de Pen/Strep pour 10 mL de milieu).
- Lorsque l'on a assez de cellules, congeler chaque clone et conserver un stock suffisant de cellules et/ou de spores.

Répéter l'opération pour chaque boîte de cellules transformées présentant une fluorescence « globale » convenable (dans le cas d'une transformation visant à introduire une protéine de fusion fluorescente).

Il est conseillé d'avoir au moins trois clones indépendants pour chaque transformation. En effet, l'insertion du gène désiré est aléatoire et peut avoir des conséquences inattendues. Pour pouvoir vérifier ce point et s'assurer que le phénotype observé est bien dû à la mutation souhaitée, il faut tester différents clones indépendants. Dans le cas de mutations visant à créer une souche cellulaire null pour une protéine, il faut, grâce à des méthodes de biologie moléculaire, s'assurer que le gène n'est plus exprimé. D'autre part, pour s'assurer que le phénotype observé est bien dû à la mutation null souhaitée, il faut aussi compléter les cellules null avec le gène correspondant et vérifier que ces cellules retrouvent bien le phénotype original « sauvage ».

7.5 Préparation des cellules et de la chambre à flux pour les expériences sous flux

7.5.1 Mesure de la concentration cellulaire

Pour mesurer la concentration cellulaire d'une culture, deux techniques de comptage sont possibles : la chambre de Malassez ou un compteur de particules³⁵. Cet appareil mesure non seulement le nombre de particules dans un volume de liquide donné, mais donne également la distribution des tailles des particules comptées. La Figure 7_2 montre une distribution des tailles caractéristique d'une culture de cellules AX2 agitée à 180 rpm à 22°C. La distribution des tailles suit une loi log normale. Le pic est centré autour de 10 μm qui est la taille caractéristique des cellules *D. discoideum*.

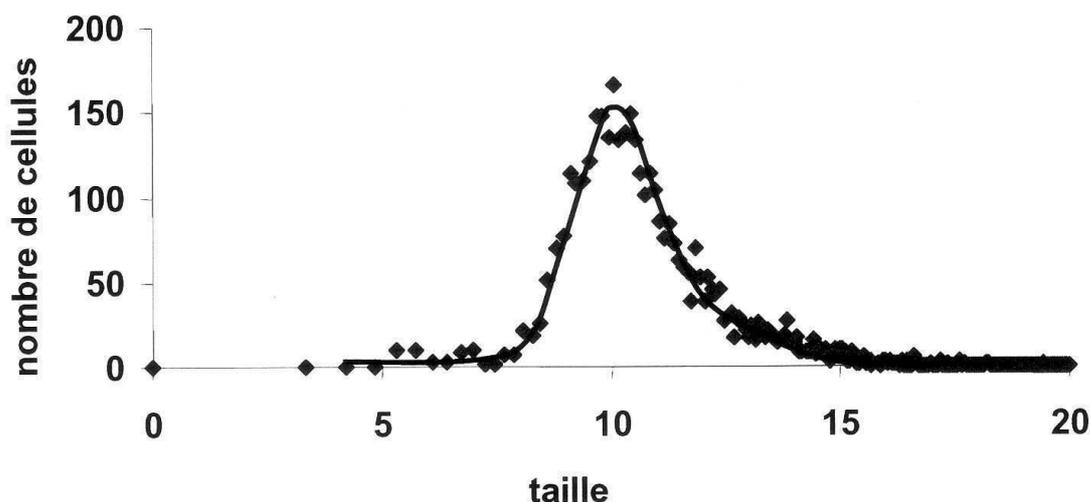


Figure 7_2: Distribution typique des tailles d'une culture agitée (180 rpm, 22°C) de cellules AX2. Ajustement par une loi log normale.

7.5.2 Lavage des cellules

Pour étudier le comportement des cellules dans une chambre à flux ou dans une chambre de chimiotactisme, on cherche la plupart du temps à travailler dans un tampon neutre, qui ne soit pas toxique pour les cellules, incolore (pour éviter d'avoir des pertes de lumière importantes due à l'absorption), non fluorescent (pour éviter d'avoir un fond fluorescent qui gêne l'observation d'une protéine fluorescente). Le milieu HL5, qui permet de

³⁵ compteur Beckman Coulter Z2

conserver des cellules dans leur phase végétative sans limite de temps (tant que la concentration cellulaire n'est pas trop élevée), est coloré, et fluorescent. Il est donc important de laver les cellules avec un tampon approprié avant de faire des expériences de microscopie. Le tampon phosphate Sørensen (ou PB, de pH 6.0) répond aux exigences citées plus haut. Les cellules peuvent rester dans leur phase végétative environ une à deux heures dans ce tampon non nutritif qui n'est pas toxique (il est toujours nécessaire d'assurer un apport d'oxygène). Au-delà, elles vont commencer leur cycle de développement. Dans toutes les expériences réalisées durant cette thèse, le PB a été utilisé pour laver les cellules et réaliser les expériences. Les cellules en phase exponentielle de croissance (entre 1 et $5 \cdot 10^6$ cellules/mL) sont lavées deux fois dans 10 mL de PB (centrifugations 400-700 g, 4°C, 5 min) à température ambiante et resuspendues avec le volume de PB nécessaire pour avoir une concentration cellulaire d'environ 10^6 cellules/mL. Les cellules sont alors injectées dans la chambre à flux et on les laisse sédimenter sur le substrat le temps désiré.

7.5.3 Traitement de surface des lames et lamelles

Toutes les expériences ont été réalisées sur des surfaces de verre. Suivant les besoins expérimentaux et donc la chambre à flux utilisée, je me suis servi soit de lames porte objet³⁶ de 1 mm d'épaisseur, soit de lamelles couvre objet³⁷ de 170 μ m d'épaisseur. Les surfaces ont été traitées pour les rendre propres et hydrophiles.

Voici le protocole de traitement des lames et lamelles.

- Laver avec un détergent ionique en frottant (délicatement avec les lamelles).
- Rincer abondamment à l'eau du robinet (de préférence chaude)
- Baigner les lames/lamelles dans une solution de soude de concentration 14,5 M pendant 10 minutes avec une légère agitation.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée.
- Laisser sécher à l'air libre.

Le caractère hydrophile des lames et lamelles peut être vérifié en mesurant l'angle de contact d'une goutte d'eau sur le substrat. Dans ces conditions, cet angle est de 31° (Décavé et al., 2002) mettant en évidence le caractère aplati de la goutte qui s'étale sur le substrat. Les lames et lamelles ainsi traitées peuvent être utilisées tout le long de la journée en prenant soin de les conserver dans un endroit sec, non poussiéreux.

³⁶ lames Esco, 75x25 mm²

³⁷ lamelles Menzel-Gläser, 25x60 mm², #1

Pour étudier les réponses cellulaires à des forces mécaniques, nous avons conçu et mis en place des dispositifs expérimentaux permettant d'appliquer des contraintes de cisaillement sur des cellules adhérant à un substrat. Ces contraintes de nature hydrodynamique sont contrôlées par l'expérimentateur. Deux chambres à flux ont été utilisées, une utilisant des lames, l'autre permettant l'utilisation de lamelles et donc des observations à plus fort grossissement.

7.5.4 Chambre à flux latéral à lames

La chambre à flux latéral à lames (Fig. 7_3) est composée d'un support en plexiglas, dans lequel est insérée une lame de verre, et d'un couvercle vissé par dessus. La distance e entre la lame et le couvercle est déterminée par un joint en téflon d'une épaisseur de $190\ \mu\text{m}$. On positionne également un joint en parafilm sous la lame, pour éviter les fuites de liquide. Les deux trous à chaque extrémité du couvercle permettent l'arrivée et l'évacuation du fluide. Le débit est contrôlé par la différence de hauteurs des niveaux du réservoir supérieur et du réservoir inférieur.

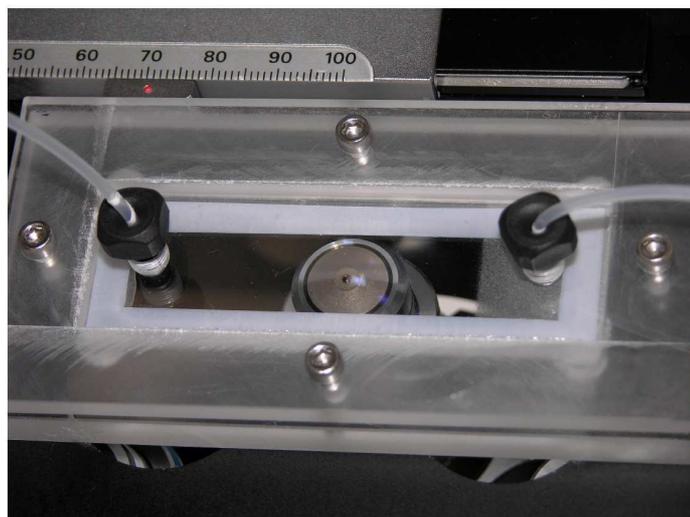
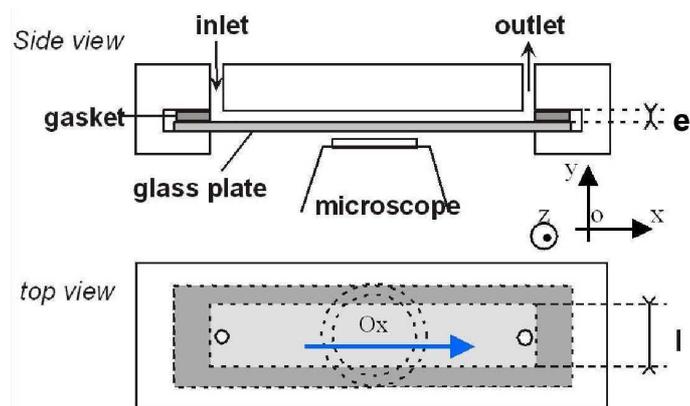


Figure 7_3: A) Représentation schématique de la chambre à flux latéral à lames. B) Photographie de cette chambre sur la platine d'un microscope.

Les chambres sont transparentes et laissent donc passer la lumière qui vient du haut. Les cellules sont observées à travers la lame ou la lamelle grâce à un microscope confocal inversé Zeiss LSM 410 qui permet d'enregistrer simultanément des images en contraste de phase et de fluorescence confocale.

Les cellules, qui adhèrent au substrat, sont soumises à une contrainte de cisaillement hydrodynamique dont nous allons maintenant établir l'expression en fonction des paramètres contrôlés par l'expérimentateur : débit volumique D , épaisseur de la chambre e , largeur de la chambre l , et viscosité dynamique du liquide η .

7.5.5 Calcul de la contrainte hydrodynamique appliquée

Pour calculer la contrainte hydrodynamique appliquée par un écoulement circulant dans une chambre à flux de ce type, on remarque que la largeur l est très grande devant l'épaisseur e (l vaut 13 mm). On peut donc ramener ce calcul au cas d'un écoulement suivant la direction Ox entre deux plaques planes, parallèles et infinies. On se trouve alors dans le cas d'un écoulement de Poiseuille plan. On obtient alors (voir calcul et grandeurs p. 72) :

$$\sigma = \frac{6D\eta}{le^2}$$

Expérimentalement, pour $D = 11$ mL/min, $e = 190$ μm , $l = 13$ mm, $\eta_{\text{eau}} = 10^{-3}$ Pl, on obtient : $\sigma = 2,3$ Pa.

7.5.6 Chambre à flux latéral à lamelles

Pour pouvoir observer les cellules à l'aide d'objectifs à fort grossissement, à immersion et possédant de faibles distances de travail, notamment pour enregistrer la fluorescence des cellules avec un microscope confocal, il était nécessaire de développer une nouvelle chambre à flux permettant l'utilisation de lamelles d'épaisseur 170 μm .

Les exigences de construction de la chambre étaient les suivantes :

- possibilité d'utiliser des lamelles d'épaisseur 170 μm
- possibilité de changer les lamelles après chaque expérience (traitements soude aisés)
- système de fermeture sans risque de briser la lamelle
- bonne étanchéité sur au moins 30 minutes
- nécessité d'utiliser des matériaux transparents
- minimiser la courbure de la lamelle pour pouvoir suivre les cellules dans de bonnes conditions, notamment lors d'une variation brusque de débit

- permettre le positionnement et la liberté de mouvement de l'objectif sous la chambre, l'objectif étant quasiment en contact avec la lamelle (objectif à immersion).

J'ai donc développé plusieurs types de chambres à flux reposant sur différentes technologies (joints en silicone³⁸, paraffine, collages³⁹ sur support métallique). Tous ces prototypes se sont avérés peu pratiques (trop de courbure de la lamelle ou utilisation impossible (fuites) sur des périodes de temps de plus de 5 minutes sous la pression de la colonne d'eau ou apparition de fissures dans la lamelle avant la fermeture de la chambre...).

J'ai finalement développé une chambre sur mesures adaptée aux dimensions du microscope à ma disposition (Fig. 7_4) sur le même principe que la chambre pour lames. La chambre à lamelles est donc en plexiglas pour la transparence. Il est possible de changer le substrat à chaque nouvelle expérience grâce à la fermeture mécanique, à l'aide de vis, qui provoque la compression de la lamelle entre les deux supports rigides de plexiglas. L'utilisation de joints en téflon et en parafilm, au-dessus et en dessous respectivement de la lamelle permet de conserver une bonne étanchéité sur plusieurs heures et permet à la lamelle de ne pas se briser lors de la compression mécanique. En effet, le joint en parafilm s'adapte à la lamelle (le serrage doit rester raisonnable). Pour répondre aux autres exigences :

- La structure inférieure de la chambre est adaptée à la taille des lamelles et à la taille de l'objectif 100x du microscope confocal. J'ai donc choisi d'utiliser des lamelles longues et larges (60x25mm). Le support inférieur permet ainsi l'approche de l'objectif selon l'axe vertical et laisse un minimum de liberté de mouvement dans le plan du substrat de manière à pouvoir se déplacer dans la chambre.
- Pour minimiser la courbure de la lamelle, j'ai maximisé la surface de contact lamelle-structure inférieure de la chambre de manière à réduire les degrés de liberté de la lamelle (voir Figure 7_4).
- Enfin, l'ouverture/fermeture appropriée des vannes^{40,41} contrôlant l'écoulement, et la méthode d'application du débit choisi (éventuels déplacements des béciers amont et/ou aval en lien avec l'ouverture/fermeture de telle ou telle vanne dans tel ordre, ...) permettent de changer rapidement les conditions d'écoulement tout en minimisant les éventuels mouvements de la lamelle.

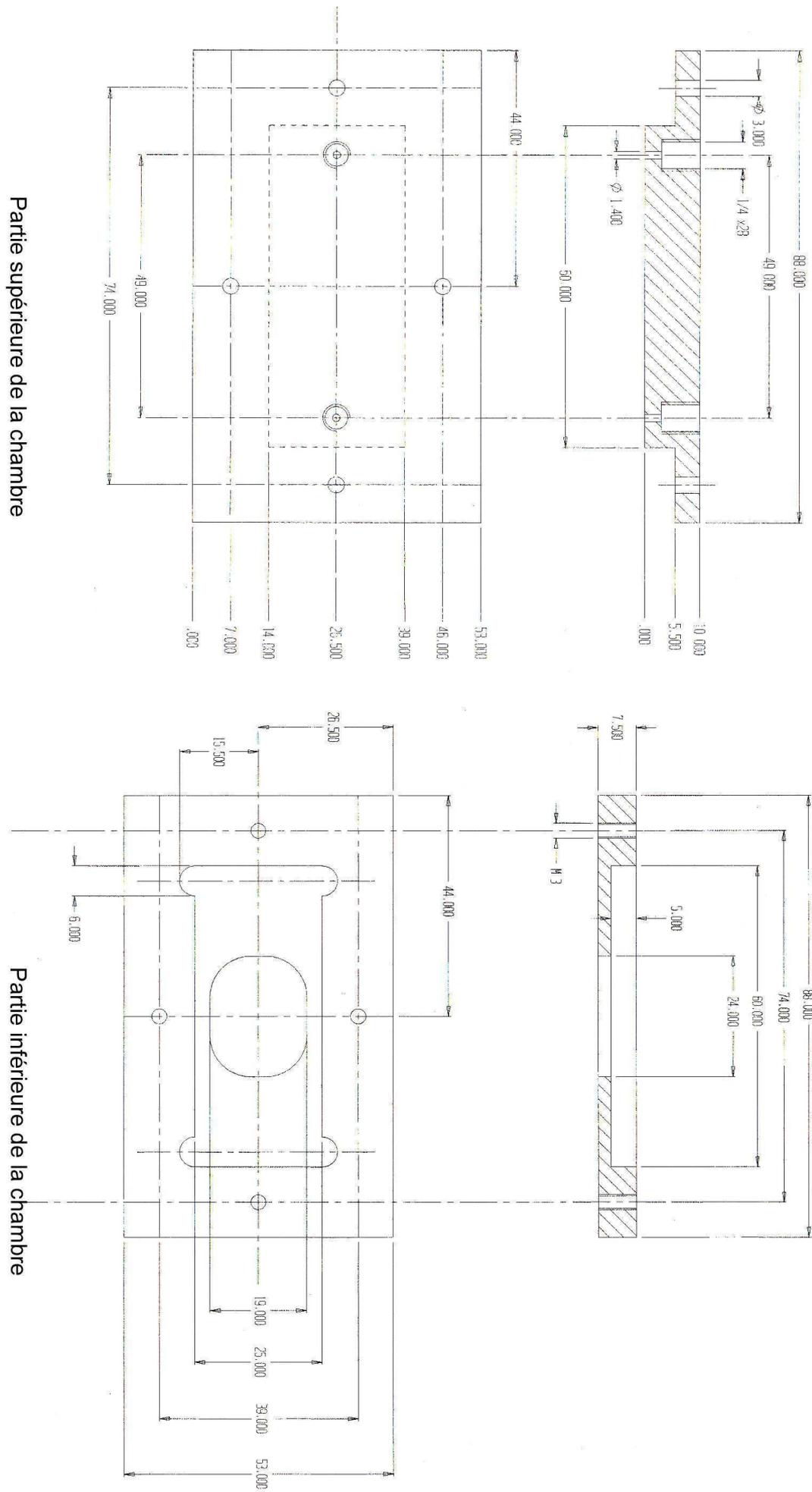
³⁸ joints en silicone : press to seal silicone isolators de Grace-Bio Labs, sous forme de feuille, réf. 10485010

³⁹ support acier inox et colles dont Araldite (colle époxy, de chez CIBA) et super-glue

⁴⁰ Vannes : Vanne Luer en polycarbonate, 3 voies, Luer Lock male 360, réf. M13335 de chez Fisher Bioblock Scientific

⁴¹ Connecteurs utilisés : matériel de chromatographie de chez Amersham Biosciences. Par exemple, a) Tubing connector M6 OD1.8, réf. 19747601, b) Tubing connector/M6 Male, réf. 19199350, c) Union luerlock female/M6 female, réf. 18102712, d) Union luerlock female/M6 male, réf. 18102762, e) tubing connector SRTC-2, réf. 19214301.

Figure 7_4: Dessins industriels de la chambre à flux latéral pour lamelles



Cette chambre s'est avérée pratique d'utilisation, sans fuite, et elle limite fortement la liberté des lamelles de se courber. Elle permet l'utilisation de différents objectifs à fort grossissement de diamètres raisonnables (inférieurs à 19 mm).

Pour vérifier le bon fonctionnement de cette chambre et la calibrer, j'ai utilisé les cellules AX2 de Grenoble (clone C1/3) et ai quantifié leur déplacement sous différents débits.

7.5.7 Calibration, vérification du bon fonctionnement de la chambre à lamelles

Pour déterminer la valeur de la contrainte de cisaillement obtenue expérimentalement en fonction du débit appliqué avec cette nouvelle chambre, j'ai mesuré l'épaisseur de la chambre à l'aide du moteur micrométrique du microscope confocal pour les différents débits utilisés. Nous avons vu que la contrainte de cisaillement s'exprime selon la relation :

$$\sigma = \frac{6D\eta}{le^2} .$$

Pour un débit de 11 mL/min, et dans les conditions d'application du flux utilisées (positionnement relatif des béciers amont et aval), j'ai mesuré une épaisseur de la chambre (effectuée en divers points de la région d'observation) de 167 μm , ce qui donne une contrainte de cisaillement théorique de 2,1 Pa. Pour un débit de 7 mL/min, j'ai mesuré une épaisseur de 205 μm , ce qui donne une contrainte de 0,9 Pa. Pour un débit de 5 mL/min, j'ai mesuré une épaisseur de 229 μm , ce qui donne une contrainte de 0,5 Pa.

Pour vérifier si ces valeurs calculées des contraintes de cisaillement sont cohérentes avec la réponse des cellules sous flux, j'ai observé le comportement des cellules AX2 (clone C1/3) sous les deux plus grands flux (le troisième étant rarement utilisé) et ai quantifié le mouvement de ces cellules (vitesse et directionnalité) pour ces débits (Fig. 7_5 et tableau 7_2). Je noterai dans la suite σ_1 et σ_2 , les deux contraintes appliquées réellement par la chambre à lamelles pour les deux débits égaux à 7 et 11 mL/min respectivement.

Cellules AX2 (C1/3) dans la chambre pour lamelles	Vitesse moyenne +/- erreur standard
contrainte de cisaillement théorique de 0.9 Pa	4,8 +/- 4,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (n = 23)
contrainte de cisaillement théorique de 2.1 Pa	9,0 +/- 6,9 $\mu\text{m}/\text{min}$ (n = 56)

Tableau 7_2: Vitesses de migration des cellules AX2 (clone C1/3) pour les deux débits testés en chambre pour lamelles.

Il apparaît inutile de tenter de remonter aux valeurs des contraintes appliquées dans la chambre à lamelles en plaçant ces mesures de vitesse sur la courbe « vitesse fonction de la contrainte » obtenue dans la chambre à lames (Fig. 7_5_E ; données de Décavé et al., 2003). En effet, la courbe « vitesse fonction de la contrainte de cisaillement » obtenue dans la chambre à lames est caractérisée par une pente très faible dans un tampon PB. Les incertitudes sur les vitesses ne permettent donc pas de déduire la valeur d'une contrainte appliquée grâce à la mesure de la vitesse moyenne des cellules. Nous avons donc préféré comparer qualitativement les distributions des vitesses et des angles du mouvement obtenues dans la chambre à lamelles avec celles obtenues dans la chambre à lames par Décavé et al. (2003) en utilisant les mêmes cellules (c'est-à-dire comparer les Figures 7_5_A, B, C et D aux Figures 7_5_F et G).

En observant la distribution des vitesses sous la contrainte σ_1 (Fig. 7_5_A) et en la comparant aux courbes de la Figure 7_5_F, il apparaît que σ_1 semble être proche de 0.7 Pa ou légèrement inférieure. En observant les courbes de directionnalité du mouvement cellulaire (Fig. 7_5_B dans la chambre à lamelles sous σ_1 et Fig. 7_5_G dans la chambre à lames), il semble que σ_1 est probablement légèrement supérieure à 0.7 Pa. En effet, la proportion de cellules migrant avec le flux sous σ_1 est supérieure à celle obtenue dans la chambre à lames sous la contrainte 0.7 Pa. En conclusion, il semble que σ_1 se situe grossièrement entre 0.5 et 1.2 Pa.

En observant la distribution des vitesses sous la contrainte σ_2 (Fig. 7_5_C) et en la comparant aux courbes de la Figure 7_5_F, il apparaît que σ_2 semble être proche de 1.9 Pa (les deux courbes ont leur pic de la distribution des vitesses autour de 6 $\mu\text{m}/\text{min}$). En comparant les distributions des angles du mouvement cellulaire sous σ_2 (Fig. 7_5_D) et dans

la chambre à flux pour différentes contraintes (Fig. 7_5_G), il semble que σ_2 est probablement supérieure à 1.9 Pa étant donné le mouvement cellulaire sous cette contrainte qui est très directionnel (mouvement avec le flux de 95 % des cellules). Il semble donc que 2.1 Pa soit une limite inférieure pour une estimation de σ_2 .

En conclusion, il apparaît que les deux valeurs des contraintes de cisaillement, 0.9 et 2.1 Pa, calculées à partir de la mesure de l'épaisseur de la chambre, sont des estimations de σ_1 et σ_2 cohérentes avec les contrôles de motilité effectués dans la chambre à lamelles. Bien entendu, les arguments ci-dessus sont très qualitatifs et ne permettent pas une estimation précise des valeurs absolues de σ_1 et σ_2 . Ces arguments, les estimations calculées théoriquement à partir de la mesure de l'épaisseur de la chambre pour les différents débits et la comparaison des Figures 7_5_A et B sous σ_1 aux Figures 7_5_C et D sous σ_2 soutiennent tous l'idée que la différence $\sigma_2 - \sigma_1$ est supérieure à 1 Pa et que σ_2 est supérieure à 2 Pa.

La chambre à lamelles permet donc d'appliquer des contraintes de cisaillement variant de 0 à environ 2-3 Pa (pour des débits utilisés entre 0 et 11 mL/min) et il est possible de déterminer les écarts relatifs entre les contraintes appliquées ainsi que d'estimer grossièrement les valeurs absolues de ces contraintes.

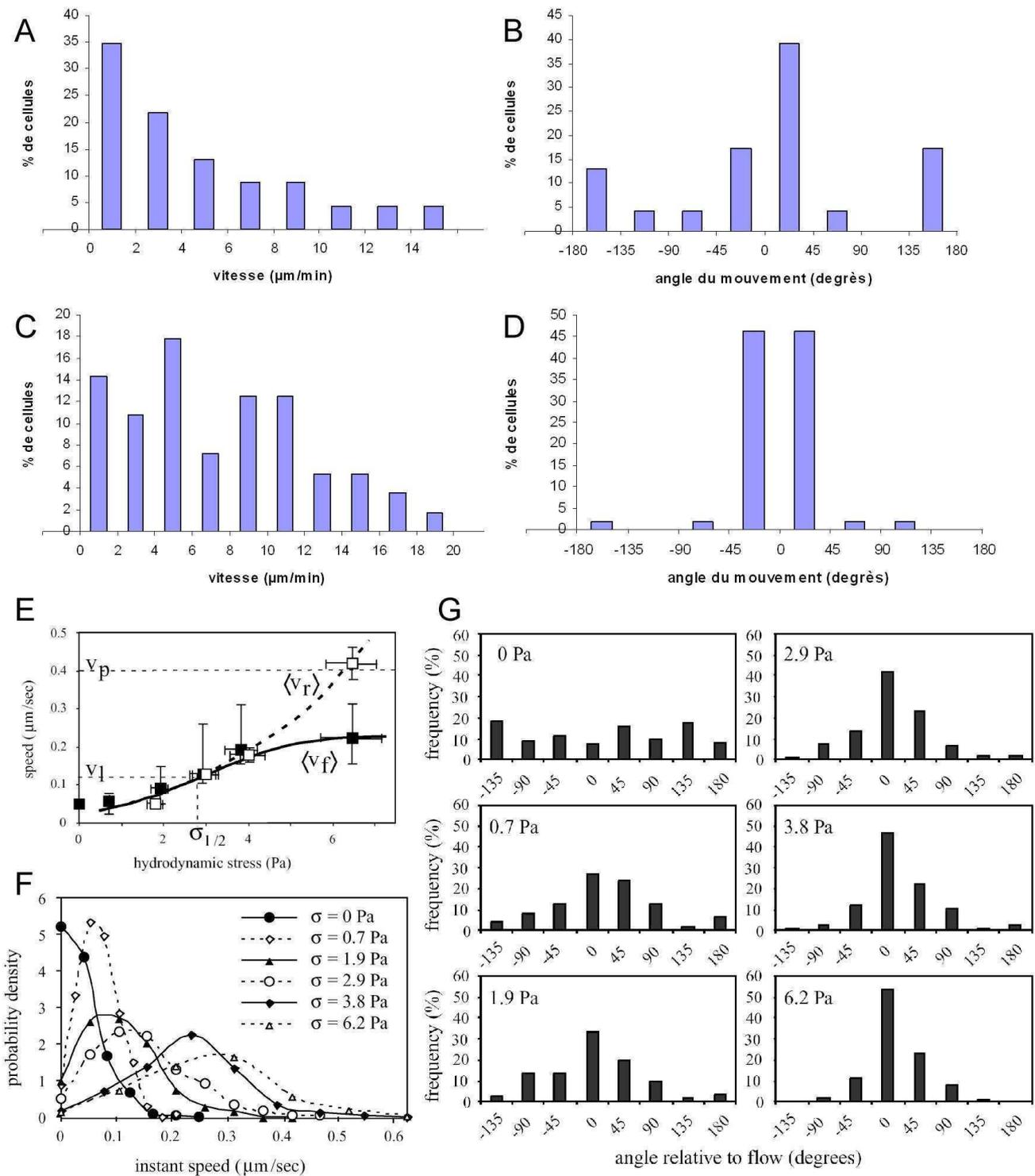


Figure 7_5: Calibration de la chambre pour lamelles.

A et B) Distributions des vitesses et des angles du mouvement obtenues dans la chambre à lamelles avec des AX2 (clone C1/3) sous la contrainte σ_1 correspondant au débit de 7 mL/min et à l'épaisseur de chambre de 205,5 μm .

C et D) Distributions des vitesses et des angles du mouvement obtenues dans la chambre à lamelles avec des AX2 (clone C1/3) sous la contrainte σ_2 correspondant au débit de 11 mL/min et à l'épaisseur de chambre de 167 μm .

E) Courbe vitesse (vitesses du front avant, v_f , et du front arrière, v_r) fonction de la contrainte de cisaillement, obtenue dans la chambre à lames avec des AX2 (clone C1/3) par Décavé et al. (2003).

F) Distributions des vitesses obtenues dans la chambre à lames pour différentes valeurs de la contrainte de cisaillement avec des AX2 (clone C1/3) par Décavé et al. (2003).

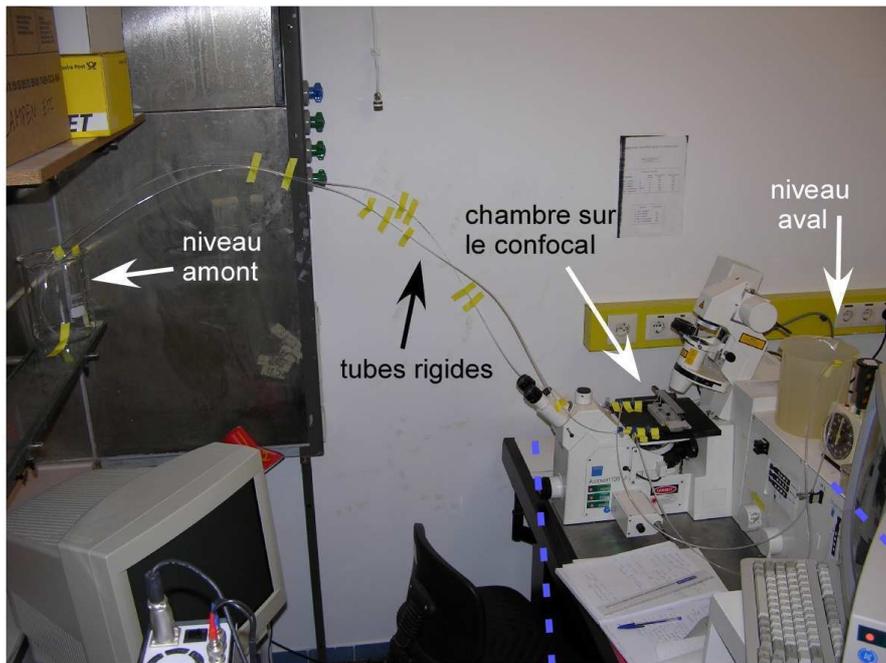
G) Distributions des angles du mouvement obtenues dans la chambre à lames pour différentes valeurs de la contrainte de cisaillement avec des AX2 (clone C1/3) par Décavé et al. (2003).

7.5.8 L'écoulement d'un bécber amont vers un bécber aval

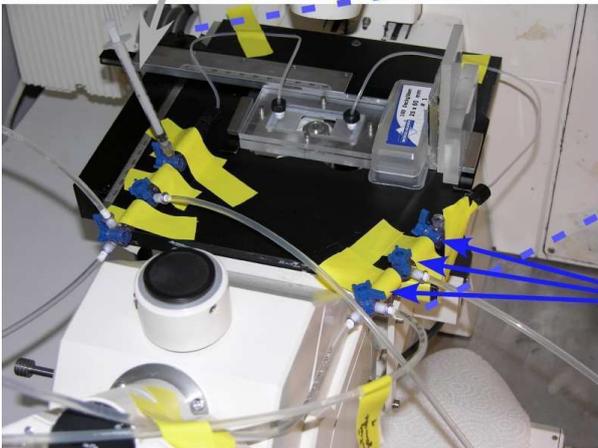
Pour engendrer un écoulement à travers la chambre, nous utilisons la différence de pressions entre les bécbers amont et aval du fait de la gravité ($\Delta P = \rho gh$). Ce procédé permet d'appliquer des contraintes de cisaillement contrôlées et de manière très stable (pas d'à coup de l'écoulement dû par exemple au pas d'un moteur pas à pas d'un pousse-seringue pour des faibles taux de cisaillement).

On remplit d'abord l'ensemble du dispositif (chambre et tuyaux⁴²; Fig. 7_6) en tampon PB, en prenant bien soin d'éliminer toutes les bulles d'air de la chambre et des tuyaux : une bulle d'air aurait pour effet de décoller les cellules sur son chemin. Ensuite, on coupe le flux et on injecte environ 1 mL de tampon PB contenant 10^6 cellules. On laisse les cellules sédimenter deux minutes, à contrainte nulle, puis on élimine les cellules non adhérentes avec un flux de faible débit (< 1 mL/min, $\sigma < 0,2$ Pa), pendant 3 minutes. Finalement, on applique la contrainte désirée. Le débit est contrôlé par la hauteur des réservoirs amont et aval. Après avoir réglé la mise au point, on lance l'acquisition d'images pendant le temps voulu.

⁴² Les tuyaux sont de deux sortes : des tuyaux rigides (de chez Manuril) pour connecter bécbers et chambre sur de longues distances et tuyaux fins à l'entrée et à la sortie de la chambre (Tefzel tubing 2m, 1.2ID, 1.8OD, réf. 19437001 de chez Amersham Biosciences).



seringue d'injection des cellules dans la chambre



vannes de contrôle de l'écoulement



contrôle informatisé du confocal

Figure 7_6: Dispositif expérimental : chambre à flux, écoulement d'un béccher amont vers un béccher aval et microscope confocal à balayage laser LSM410.

7.6 Expériences de chimiotactisme

Après avoir observé le processus de réorientation sous flux, il semblait intéressant de le comparer au processus de réorientation de cellules se déplaçant vers une source d'AMPc. J'ai donc réalisé des expériences de chimiotactisme durant lesquelles j'attirais des cellules (de préférence une cellule isolée) vers l'extrémité d'une micropipette remplie d'AMPc. Lorsque la cellule se rapprochait de cette extrémité avec une forme bien allongée et polarisée, la micropipette était déplacée le plus rapidement possible du côté de l'arrière de la cellule, ceci afin de la forcer à se réorienter. Comme pour les expériences sous flux, les mêmes analyses quantitatives de relocalisation de protéines fluorescentes ont été réalisées.

Protocole pour effectuer une expérience de chimiotactisme :

- L'AMPc⁴³ est dilué dans du PB à la concentration de 10^{-3} M et stérilisé. Cette solution stérile est conservée sous forme d'aliquots de 1 mL placés à -20°C .
- A partir d'un eppendorf de ce stock, diluer par 10 dans du PB afin d'obtenir une solution d'AMPc à la concentration de 10^{-4} M. Cette solution est celle qui sera utilisée pour remplir la micropipette afin de réaliser l'expérience.
- Préparer les cellules carencées (voir protocole de régime forcé) et les déposer dans une chambre constituée d'une lamelle carrée⁴⁴ et d'un anneau en plexiglas de diamètre 4 cm scellé à la lamelle avec une pâte de silicone⁴⁵.
- Pour chaque expérience, une nouvelle micropipette stérile⁴⁶ est remplie d'AMPc à l'aide d'une aiguille métallique. D'abord, laisser une goutte d'AMPc remplir la pipette par capillarité, puis introduire l'aiguille métallique jusqu'au bout dans la pipette et injecter efficacement la solution d'AMPc afin de faire sortir toutes les bulles d'air de la pipette qui pourraient gêner la sortie d'AMPc.
- Visser la micropipette au bout d'une tige métallique qui servira pour la fixation sur l'appareil de micromanipulation⁴⁷.
- Vérifier à l'aide d'un microscope que l'extrémité de la pipette n'est pas cassée.
- Fixer le support avec la pipette sur l'appareil de micromanipulation (Ne pas laisser l'extrémité de la pipette à l'air libre car elle risque de sécher et d'empêcher la diffusion de l'AMPc au cours de l'expérience).

⁴³ cAMP Na-salt de chez Sigma, réf. A6885

⁴⁴ lamelles de verre utilisées pour les expériences de chimiotactisme : coverslips 50x50mm de Menzel-Gläser #1,5

⁴⁵ Silicon-Hochvakuumfett schwer, réf. 1.07921.0100 de chez Merck

⁴⁶ Sterile Femtotips Eppendorf, Bestell-Nr 5242 952.008

⁴⁷ Micromanipulateur : Eppendorf, Micromanipulator S171

- Trouver l'extrémité de la pipette et la positionner en contact avec la lamelle de la chambre d'expérience. Cette recherche se fait en observant l'ombre de la pipette et en jouant avec le micromanipulateur afin de rapprocher pas à pas l'extrémité de la pipette du bas de la chambre.
- Si les cellules sont bien carencées, elles sont immédiatement attirées par la source d'AMPC et se dirigent rapidement vers cette dernière en adoptant des formes très allongées.
- Lorsqu'une cellule est très proche de l'extrémité de la pipette, déplacer rapidement la pipette afin de la positionner proche du côté arrière de la cellule pour la forcer à se réorienter en inversant sa polarisation. Penser à bien surélever la pipette, sans quoi, il y a un risque d'emporter la cellule.

7.7 La microscopie confocale à balayage laser (Laser Scanning Microscopy)

La grande majorité de mes expériences ont nécessité trois types de microscopies : la microscopie à contraste de phase, la microscopie de fluorescence (dont j'ai déjà parlé dans la partie consacrée au travail sur liposomes), et la microscopie confocale (Laser Scanning Microscopy).

Les bases théoriques de la microscopie confocale ont été développées par Marvin Minsky en 1953. C'est grâce aux progrès de l'informatique et de l'électronique et à la miniaturisation des systèmes que la microscopie confocale de fluorescence à balayage laser est devenue d'usage courant.

Par essence, un microscope photonique conventionnel (par exemple, à transmission ou de fluorescence) construit l'image d'un plan objet entier. Ceci implique des contraintes sévères sur chacun des éléments optiques qui constituent ce microscope, qui doivent limiter les aberrations chromatiques et géométriques. L'une des façons les plus simples de diminuer ces contraintes physiques (méthode proposée dès les années 50) est de construire un microscope à balayage dans lequel l'objet est translaté dans les deux directions du plan objet d'un microscope ajusté selon le principe de Köhler. Le détecteur (photomultiplicateur) de ce microscope à balayage est alors réduit à un point et est exactement situé dans l'axe optique du système. Une image est donc saisie point par point, stockée dans la mémoire d'un ordinateur qui la restitue ensuite dans son intégralité. L'avantage de ce principe de balayage réside dans

le fait que tout le champ balayé est saisi par un point optiquement invariant, dont le contraste et la résolution sont constants. Le grandissement final ne dépend que du pas du balayage. Un tel système fournit des images de qualité qui, du fait de leur nature numérique, peuvent être facilement manipulées. En revanche, ce principe a le grand désavantage d'être relativement lent.

Pour accroître de façon significative la vitesse d'acquisition, une source laser, l'échantillon et le détecteur restent fixes, et un montage mécanique (système de balayage) est réalisé à l'aide d'un ensemble de miroirs oscillants qui projettent chaque point image sur le détecteur fixe. On perd alors l'avantage vu plus haut dans le cas du balayage mécanique lié au déplacement de l'échantillon, et la résolution du système à balayage optique ne peut plus s'affranchir des caractéristiques physiques optiques du système, puisque chaque point image correspond à nouveau à un élément de l'image que formerait un microscope conventionnel du même échantillon. Par contre, le grandissement des images est toujours lié au pas d'échantillonnage.

Deux idées sont alors apparues pour améliorer ce microscope à balayage. La première est de faire en sorte que la source balaye l'échantillon de façon couplée au balayage de détection (d'où le terme confocal). La deuxième consiste à interposer dans le trajet optique des filtres spatiaux (pinholes) qui limitent pour chaque point saisi la zone d'intérêt réellement illuminée et observée.

7.7.1 Couplage des balayages de la source et du détecteur

Comme pour le microscope de fluorescence, l'objectif sert à la fois d'illuminateur (condenseur) et de collecteur (objectif), ce qui rend à priori plus simple le couplage des balayages.

Pour que les résolutions spatiales du microscope soient maximales, les deux balayages couplés (de la voie d'illumination et de la voie d'observation) doivent consister à orienter la totalité du faisceau incident (condenseur) et du faisceau image (objectif) en conservant l'ouverture maximale de leurs diaphragmes focaux (contrairement au cas d'un projecteur « suiveur » de plateau de théâtre dont les dimensions géométriques du faisceau sont modifiées quand il suit un acteur et seraient donc réduites). Ainsi, au cours du balayage, tout se passe comme si la source elle-même était translatée dans un plan perpendiculaire à l'axe optique du condenseur (fixe) et que le détecteur lui-même était translaté dans le plan image de l'objectif (fixe) (Fig. 7_7).

Ce couplage des balayages permet deux choses :

- le balayage par le condenseur (l'illuminateur) peut être assimilé à la translation de l'ensemble du système d'Airy (l'image de la source considérée comme ponctuelle) dans son plan image
- le balayage de saisie est équivalent, pour le détecteur, à la poursuite de ce système d'Airy dans son plan objet.

Comme l'on s'éloigne alors de l'approximation de Gauss, on ne peut plus ignorer les aberrations chromatiques et géométriques.

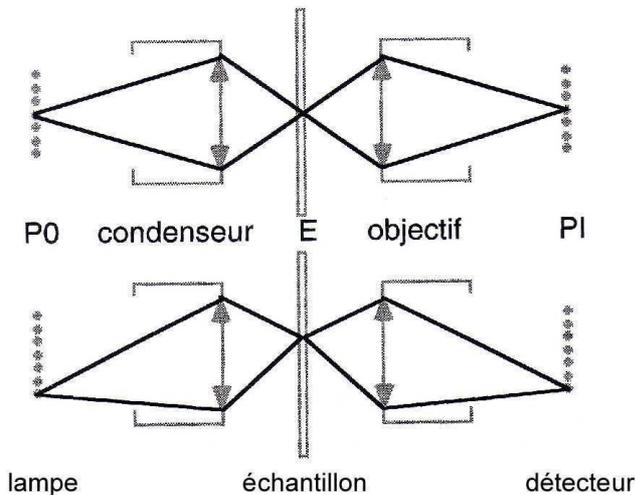


Figure 7_7: Couplage des balayages. Au cours du balayage, tout se passe comme si la source elle-même était traduite dans un plan perpendiculaire à l'axe optique du condenseur (fixe) et que le détecteur lui-même était traduite dans le plan image de l'objectif (fixe) (adapté de Cibert, 2005).

7.7.2 Les trous d'épingle (pinholes)

Les trous d'épingle sont des filtres spatiaux : ils ont pour fonction de modifier les dimensions à la fois du volume illuminé au sein de l'échantillon et du volume observé. En pratique, ce sont des diaphragmes annulaires qui arrêtent directement 1) les rayons lumineux émis par la source et qui atteindraient l'échantillon en des points situés en dessous et au-dessus du plan ainsi illuminé et 2) les rayons lumineux émis par l'échantillon à partir de points situés en dessous et au-dessus du plan que l'on souhaite observer. On a donc deux types de pinholes : un pinhole sur le trajet optique de la source laser et un pinhole situé au niveau du détecteur (photomultiplicateur) (Fig. 7_8).

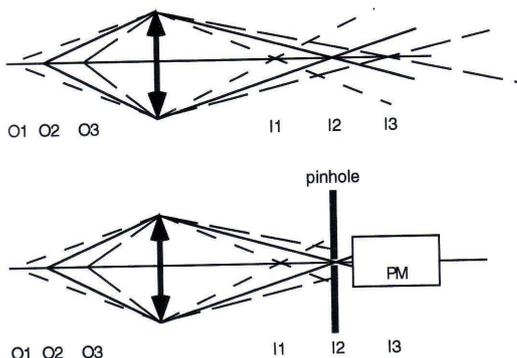
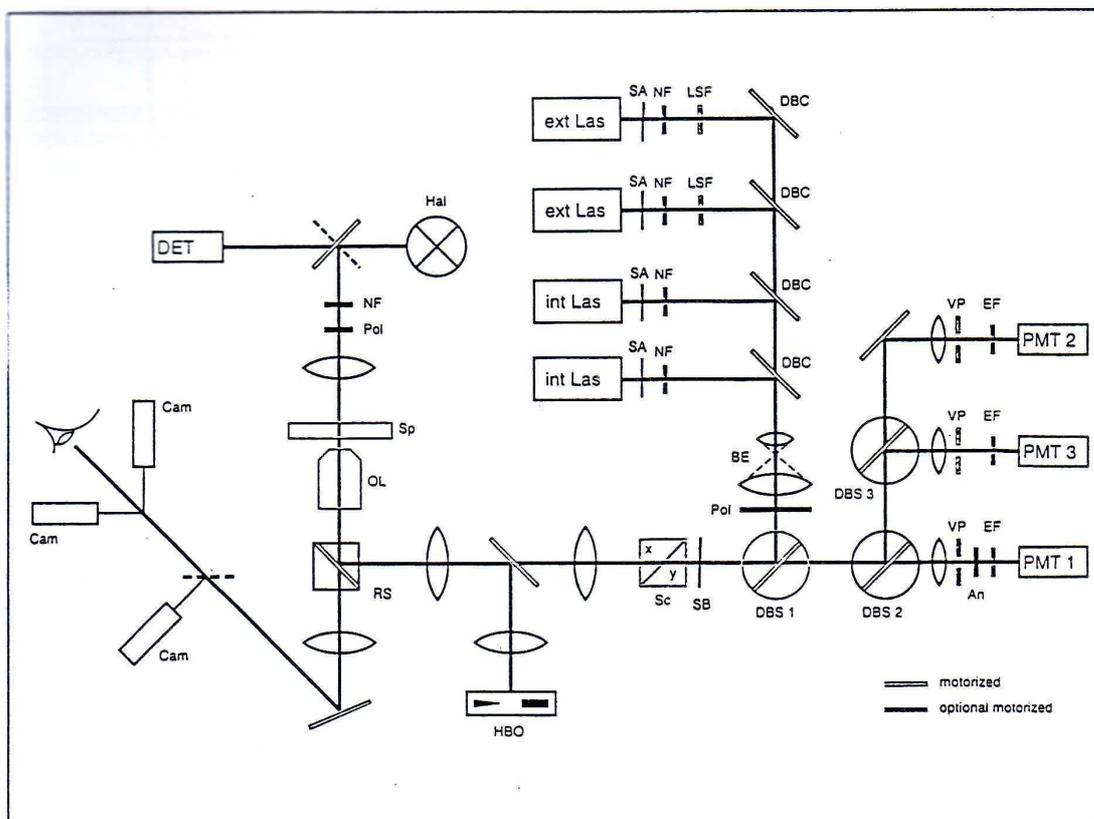


Figure 7_8: Utilisation d'un pinhole au niveau du détecteur. Ces filtres spatiaux réduisent la taille de l'objet illuminé et observé (en l'occurrence, sur ce schéma, observé) (tiré de Cibert, 2005).
PM : photomultiplicateur.

7.7.3 Schéma d'un épimicroscope confocal

Le microscope confocal à fluorescence est un simple épimicroscope à fluorescence à balayage dont la source est un laser et dans lequel sont placés des pinholes limitant les dimensions de la sonde optique d'une part et les dimensions du volume observé d'autre part (Fig. 7_9). Le système optique de balayage (mirror scanner sur la Figure 7_9 ; qui conserve l'ouverture maximale du plan focal arrière de l'objectif) est utilisé à la fois sur les trajets d'illumination de l'échantillon et de réception de la lumière de fluorescence. Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé un LSM 410 sur un statif AXIOVERT 135M (Zeiss).



Beam path of LSM 410 invert

An	Analyzer	LSF	Line filter
BE	Beam expander	NF	Neutral density filter
Cam	Port for microscope or TV camera	OL	Objective
DBC	Dichroitic beam combiner	PMT	Photomultiplier
DBS	Dichroitic beam splitter	Pol	Polarizer
Det	Transmitted-light detector for LSM	RS	Reflector slider
EF	Emission filter	SA	Safety shutter A for laser light
ext Las	External laser	SB	Safety shutter B for laser light
Hal	Conventional transmitted-light illumination by halogen lamp	Sc	Mirror scanner
HBO	Mercury lamp	Sp	Specimen
int Las	Internal laser	VP	Variable pinhole

Displayed is the maximum number of components.

Figure 7_9: Chemin du rayon lumineux dans le microscope confocal à balayage laser inversé, LSM 410.

Le détecteur est obligatoirement un système optoélectronique (photomultiplicateur). Les microscopes confocaux à balayage laser sont donc obligatoirement pilotés par un ordinateur hôte dans lequel on introduit les paramètres de saisie des images : le grandissement de l'objectif utilisé, son ouverture numérique, ainsi que le zoom éventuel souhaité, les coordonnées et les dimensions de champ balayé sur chaque coupe, les ouvertures des pinholes, le nombre de balayages à réaliser par coupe optique, les vitesses de balayage et les temps de saisie des images. Dans le cadre de ma thèse, le logiciel permettant l'acquisition des images était le logiciel « Carl Zeiss LSM », version 3.98 installé sous Windows 95.

7.7.4 Résolution du microscope confocal à fluorescence

Plusieurs paramètres définissent la résolution du microscope confocal à fluorescence.

- D'abord, l'objectif est important. Il sert à la fois à illuminer l'échantillon et à recueillir la lumière de fluorescence. Plus l'ouverture numérique de l'objectif est grande, meilleure est sa résolution, puisque :

$$\text{résolution} = k \lambda / \text{ON},$$

où k est une constante qui dépend de l'ouverture du pinhole, λ est la longueur d'onde d'excitation (ou, selon l'ouverture du pinhole, une longueur d'onde théorique exprimée en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission), et ON est l'ouverture numérique de l'objectif.

- L'ouverture des pinholes. Comme on l'a déjà vu, ces filtres spatiaux sont placés dans le faisceau pour réduire les dimensions du point de l'espace illuminé au sein de l'échantillon (sonde optique) et ne recueillir que la lumière de fluorescence de ce point illuminé.
- La fréquence de balayage. Si la sonde optique est parfaitement définie dans l'espace, elle ne représente que l'outil qui va permettre de balayer l'échantillon dans les trois directions de l'espace de façon discrète. C'est alors la fréquence de balayage qui va définir la distance entre deux points de mesure.
- Le rapport entre les longueurs d'onde du laser et de la lumière de fluorescence va aussi apparaître dans le calcul de la longueur d'onde théorique (Cibert, 2005).

Dans le cadre de ma thèse, la majorité des films ont été enregistrés avec l'objectif 100x/1,30, avec des pinholes relativement fermés (comme conseillé pour chaque objectif), avec des tailles d'images de 256x256 pixels, et avec des protéines fluorescentes GFP ($\lambda_{\text{exc}} =$

488 nm) et/ou mRFP ($\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm). Cela correspond à une résolution dans le plan horizontal de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$ et à une résolution selon l'axe vertical d'environ $1 \mu\text{m}$. Dans ces conditions de prise de vue, le pas d'échantillonnage ne diminue quasiment pas la résolution optique qui est alors proche des dimensions de la sonde optique.

7.7.5 Réglages de la brillance et du contraste

Ce réglage se fait au niveau du logiciel d'acquisition d'images en fonction de l'intensité de fluorescence observée avec chaque cellule. Le but du réglage de ces deux paramètres est d'obtenir la plus grande étendue de gris entre les deux valeurs extrêmes qui sont 0 (noir) et 255 (blanc) pour des images 8 bits. Il faut éviter la saturation (contraste pas trop élevé) tout en cherchant à distinguer le plus possible les variations d'intensité (contraste suffisamment élevé). De plus, il faut veiller à réduire le bruit de l'image en utilisant des contrastes qui ne soient pas trop élevés.

7.7.6 Les sources, filtres d'émission et miroirs dichroïques utilisés

Les filtres d'émission sont choisis en fonction des protéines fluorescentes observées. Dans mon cas, les deux protéines fluorescentes utilisées furent la GFP (différentes versions comme la S65T-GFP ou la EGFP, voir le paragraphe suivant) et la mRFP-Mars (Fischer et al., 2004). Pour exciter la GFP, une source laser à argon ionisé (Ar+) de 488 nm fut utilisée et pour exciter la mRFP-Mars, un laser hélium-néon (He-Ne) en utilisant la transition dans le vert à 543 nm. J'ai utilisé les filtres et miroirs suivants :

- dans le cas de l'observation d'une seule protéine fusionnée à la GFP : un filtre d'émission LP520 avec un miroir dichroïque FT488.
- dans le cas d'une observation simultanée d'une protéine fusionnée à la GFP et d'une protéine fusionnée à la mRFP-Mars : pour la GFP, un filtre BP510-525, et pour la mRFP, un filtre LP575-640, avec un miroir dichroïque FT488/543. L'utilisation de ces filtres permet d'éviter que la fluorescence d'une des protéines n'apparaisse dans la voie d'observation de l'autre.

7.8 Le développement des protéines fluorescentes : la GFP et la mRFP

La protéine Green Fluorescent Protein (GFP) a initialement été isolée de la méduse *Aequorea Victoria* en 1962 (Fig. 7_10_A ; Shimomura et al., 1962). Shimomura voulait comprendre la biochimie impliquée dans la bioluminescence d'*Aequorea*, mais n'était pas intéressé par une éventuelle application de la GFP. Ce n'est que 30 ans plus tard que Prasher eut l'idée d'utiliser la GFP en tant que traceur pour suivre la production et la localisation d'une protéine d'intérêt. Le gène de la GFP a ainsi été cloné en 1992 (Prasher et al., 1992). C'est finalement Ghia Euschirken du groupe de Martin Chalfie qui réussit la première à incorporer le gène de la GFP dans *E.coli* si bien que ces cellules fluorescaient avec une coloration verte quand elles étaient irradiées avec de la lumière bleue (Chalfie et al., 1994). L'expression endogène ou hétérologue de la GFP ne requiert l'addition d'aucun groupe prosthétique (protéines, substrats ou co-facteurs d'*Aequorea*) pour être fluorescente (Heim et al., 1994; Tsien, 1998). Elle acquiert ses propriétés de fluorescence par un mécanisme autocatalytique de formation du fluorophore. La GFP est une protéine de 238 acides aminés, compacte et globulaire, de masse moléculaire 27 kDa et de dimensions 2,4 par 4,2 nm (Ormö et al., 1996).

S'ensuivirent de nombreux travaux de mutagenèse pour développer des protéines qui restent à l'état de monomère, possèdent des caractéristiques d'absorption et d'émission variées, qui sont plus brillantes, possèdent un meilleur repliement et ont des meilleures propriétés d'expression. Par exemple, le remplacement de la tyrosine 66 par une histidine donna naissance à une protéine qui fluoresce dans le bleu permettant alors la visualisation *in vivo* de l'expression de deux gènes simultanément (Heim et al., 1994). La substitution d'un autre unique acide aminé, la sérine en position 65, par une thréonine (mutation S65T) permit d'accélérer la vitesse de formation du fluorophore et aussi de convertir les deux pics d'absorption de la GFP sauvage en un seul pic d'absorption à environ 490 nm (Fig. 7_10_B ; Heim et al., 1995). Une autre série de mutations a permis de limiter la dimérisation naturelle de la GFP à de fortes concentrations (Zacharias et al., 2002). Il est en effet important d'avoir une protéine fluorescente traceur qui ne forme pas d'agrégats car ces associations peuvent modifier la biochimie de la protéine d'intérêt et ne permettent pas un rôle de reporteur fluorescent sans influence. Toutes ces modifications ont donné naissance à la version EGFP de la GFP pour « Enhanced » GFP, version plus brillante conservant le spectre d'émission de la molécule sauvage.

Cette version EGFP permet de visualiser des protéines de fusion avec de faibles intensités lumineuses excitatrices, sur plusieurs heures, et avec peu de blanchiment. Cela rend donc possible l'analyse dynamique, entre autres, de voies de signalisation intracellulaires, du mouvement d'organelles et des réarrangements du cytosquelette.

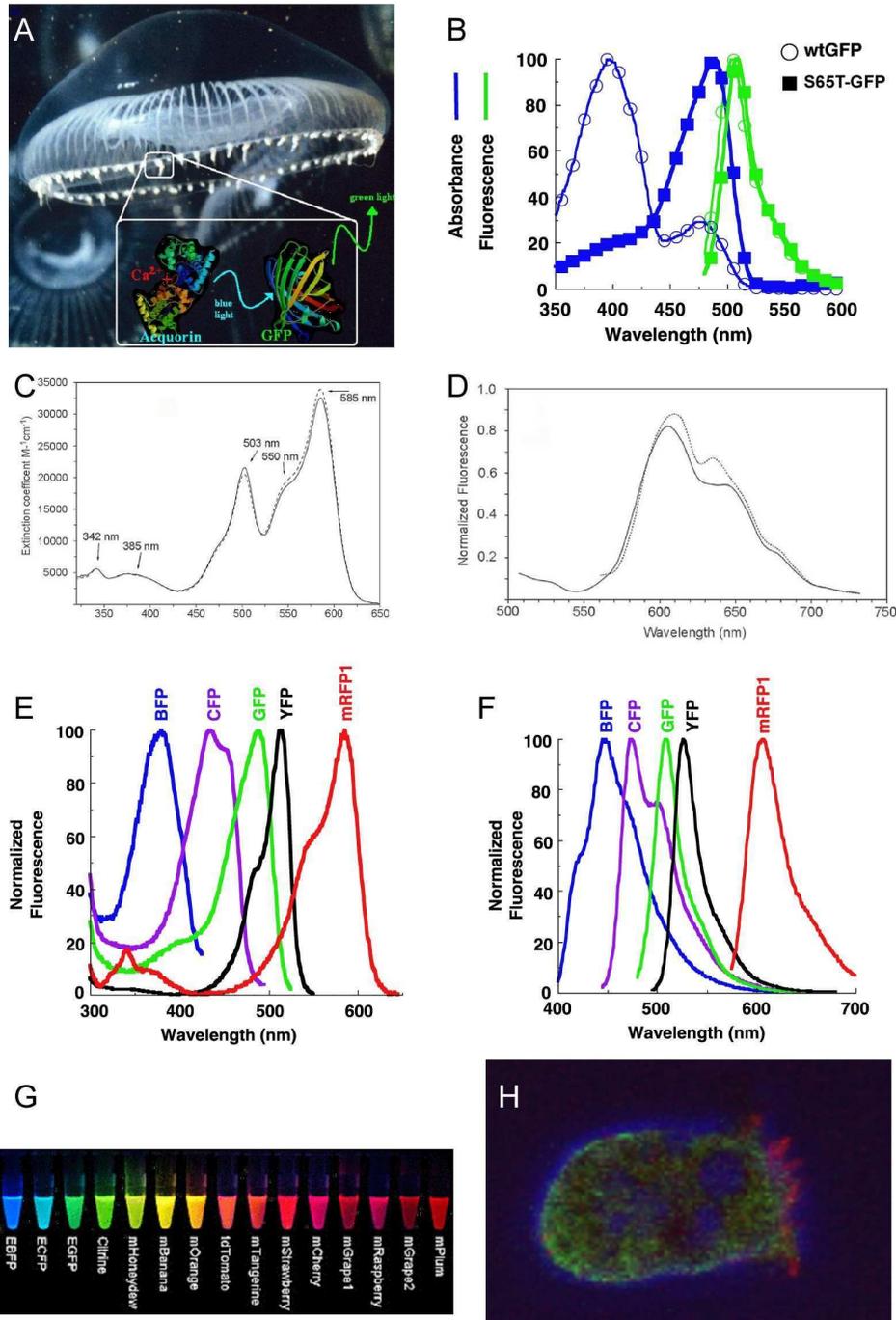


Figure 7_10: **A**) La méduse *Aequorea Victoria* (Shimomura et al., 1962). **B**) Spectres d'absorption et d'émission des protéines GFP sauvage et S65T-GFP (obtenue en remplaçant la sérine en position 65, par une thréonine). Le double pic d'absorption de la GFP sauvage devient un simple pic d'absorption autour de 490 nm pour la S65T-GFP (Heim et al., 1995). **C**) Spectres d'absorption de la mRFP1 et de mRFPmars à pH 7.0. **D**) Spectres d'émission de cellules *Dictyostelium* exprimant la mRFPmars-LimEΔcoil en l'excitant à 488 nm (ligne pleine) ou à 543 nm (ligne pointillée) (Fischer et al., 2004). **E et F**) Spectres d'absorption (E) et d'émission (F) de diverses protéines fluorescentes (tiré de Lippincott-Schwartz and Patterson, 2003). **G**) Large éventail des protéines fluorescentes actuellement disponibles (Tsien lab). **H**) Une cellule *Dictyostelium discoideum* marquée par de la GFP-myosine-II (rétraction) et de la mRFPmars-LimEΔcoil (front avant).

D'autre part, il peut être utile d'adapter chaque protéine fluorescente à l'organisme dans lequel on veut utiliser cette technologie. Par exemple, afin d'obtenir une expression plus importante chez les cellules humaines ou d'autres mammifères, un clone dénommé hGFP-S65T, possédant des codons « humanisés », a été réalisé en 1996 (Zolotukhin et al., 1996). Le gène *gfp* sauvage contient en effet plusieurs codons qui ne sont pas communément utilisés chez les mammifères. Plus de 190 mutations silencieuses y ont ainsi été incorporées. Ces mutations permettent d'obtenir une protéine 35 fois plus fluorescente que la GFP sauvage et 5 à 10 fois plus exprimée dans les cellules de mammifères.

De nombreuses tentatives de décaler le spectre d'émission de la GFP d'*Aequorea* vers le rouge, pour développer des expériences utilisant plusieurs couleurs, ont eu peu de succès et c'est finalement la recherche de protéines fluorescentes dans d'autres organismes marins (parfois non fluorescents !) qui ont permis la découverte de protéines fluorescentes possédant des spectres d'émission décalés vers le rouge (Matz et al., 1999; Fradkov et al., 2000; Lukyanov et al., 2000; Labas et al., 2002). En particulier, DsRed, découverte dans une espèce *Discosoma* (corail), montre des maxima d'excitation et d'émission à 558 et 583 nm respectivement (Matz et al., 1999). Cependant, cette protéine mature lentement et forme un tétramère (Baird et al., 2000). Grâce à la substitution de 33 acides aminés dans DsRed, il fut possible d'obtenir une protéine monomérique, mRFP1, qui mature plus rapidement (environ une heure) (Campbell et al., 2002). Malheureusement, les fluorescences de DsRed et de mRFP1 étaient toujours trop faibles pour acquérir des images avec des résolutions spatiale et temporelle suffisantes chez *Dictyostelium discoideum*. C'est pourquoi, de nouvelles recherches ont eu lieu pour améliorer les caractéristiques de DsRed. Finalement, un gène fut synthétisé qui code un dérivé de DsRed en combinant deux sets de mutations pour, d'une part, rendre la protéine monomérique et, d'autre part, pour améliorer sa fluorescence in vivo. De plus, la séquence de ce gène fut optimisée en accord avec le génome de *Dictyostelium* qui est riche en bases A/T. La nouvelle version de DsRed ainsi obtenue, nommée mRFP-Mars, est monomérique et très brillante in vivo chez *Dictyostelium* (Fischer et al., 2004). Elle permet de visualiser de nombreuses structures comme le cytosquelette d'actine ou les microtubules (voir son spectre d'excitation et d'émission : Fig. 7_10_C et D). C'est cette protéine que j'ai utilisée dans le cadre de ma thèse pour visualiser simultanément l'assemblage de la myo-II en filaments épais (avec la GFP-myo-II) et la formation de nouvelles protrusions par polymérisation de l'actine (avec la mRFP-Mars-LimE- Δ CC) (Fig. 7_10_H).

La GFP et ses variants ont été exprimés de manière hétérologue dans des cellules et organismes aussi divers que des bactéries, des levures, des cellules eucaryotes animales et

végétales (voir les spectres, respectivement, d'excitation et d'émission de protéines fluorescentes courantes : Fig. 7_10_E et F).

Aujourd'hui, l'éventail de protéines fluorescentes est large (Fig. 7_10_G) et la GFP et ses variants peuvent être fusionnés à virtuellement toutes les protéines d'intérêt pour analyser l'expression des gènes correspondants, la localisation des protéines, leur mouvement et leur chimie dans des cellules vivantes, apportant ainsi un outil précieux dans la quête de compréhension de la fonction des protéines. Leur intérêt est aussi d'être moins phototoxiques que ne peuvent l'être des molécules comme la FITC (fluorescéine isothiocyanate).

Néanmoins, il faut être prudent dans l'utilisation de tels reporteurs. En effet, il est important de s'assurer que la protéine fluorescente fusionnée à la protéine d'intérêt ne dérange pas la localisation de cette protéine ainsi que son interaction avec d'autres protéines ou ne soit pas trop surexprimée car une trop grande abondance de la protéine de fusion (en plus de la protéine endogène non marquée) pourrait altérer le phénotype cellulaire. Par exemple, il a été suggéré que la GFP- α -tubuline s'incorpore dans les microtubules avec une efficacité moindre que l' α -tubuline endogène, avec un possible effet de la GFP- α -tubuline sur la nucléation des microtubules (Kimble et al., 2000). La possibilité d'une sensibilité accrue à la lumière bleue des cellules exprimant la GFP- α -tubuline a aussi été avancée dans la même étude. Un autre aspect réside dans la construction de la protéine de fusion. Par exemple, la myo-II-GFP (GFP du côté C-terminal de la myo-II ne permet pas l'assemblage de la protéine de fusion en filaments épais et donc ne permet pas le sauvetage de cellules myo-II-null. Au contraire, l'expression de la GFP-myo-II (GFP du côté N-terminal de la myo-II) dans des cellules myo-II-null permet l'assemblage en filaments épais et redonne ainsi le phénotype sauvage à ces cellules (Moore et al., 1996; pour une revue, voir Gerisch and Müller-Taubenberger, 2003).

7.9 Traitement et analyse d'images

7.9.1 Quantification du mouvement cellulaire sous flux (vitesse et directionnalité)

Pour observer le comportement global des souches cellulaires sous flux, j'ai réalisé des expériences avec la chambre à flux pour lames et avec un objectif 20x/0,5, en appliquant une contrainte de cisaillement de 2,3 Pa. Les enregistrements durent 10 minutes. Cet objectif permet de visualiser entre 10 et 20 cellules simultanément et permet donc une analyse statistique de la réponse cellulaire à l'application du flux.

Pour toutes les analyses de films obtenus avec cet objectif 20x, j'ai utilisé un programme (qui tourne sous Image J) qui mesure pour chaque image les coordonnées du centre de gravité de chaque cellule. Ce programme repose sur l'utilisation d'opérations couramment utilisées en traitement d'images (filtres gaussien, médiane, maximum, application d'un flou, d'un seuil, inversion des gris, soustraction de fond, ...; Fig. 7_11). Pour ne pas prendre en compte les cellules qui sont passivement emportées avec le flux et se détachent, je ne considère que les cellules qui restent sur le substrat pendant au moins 3 minutes.

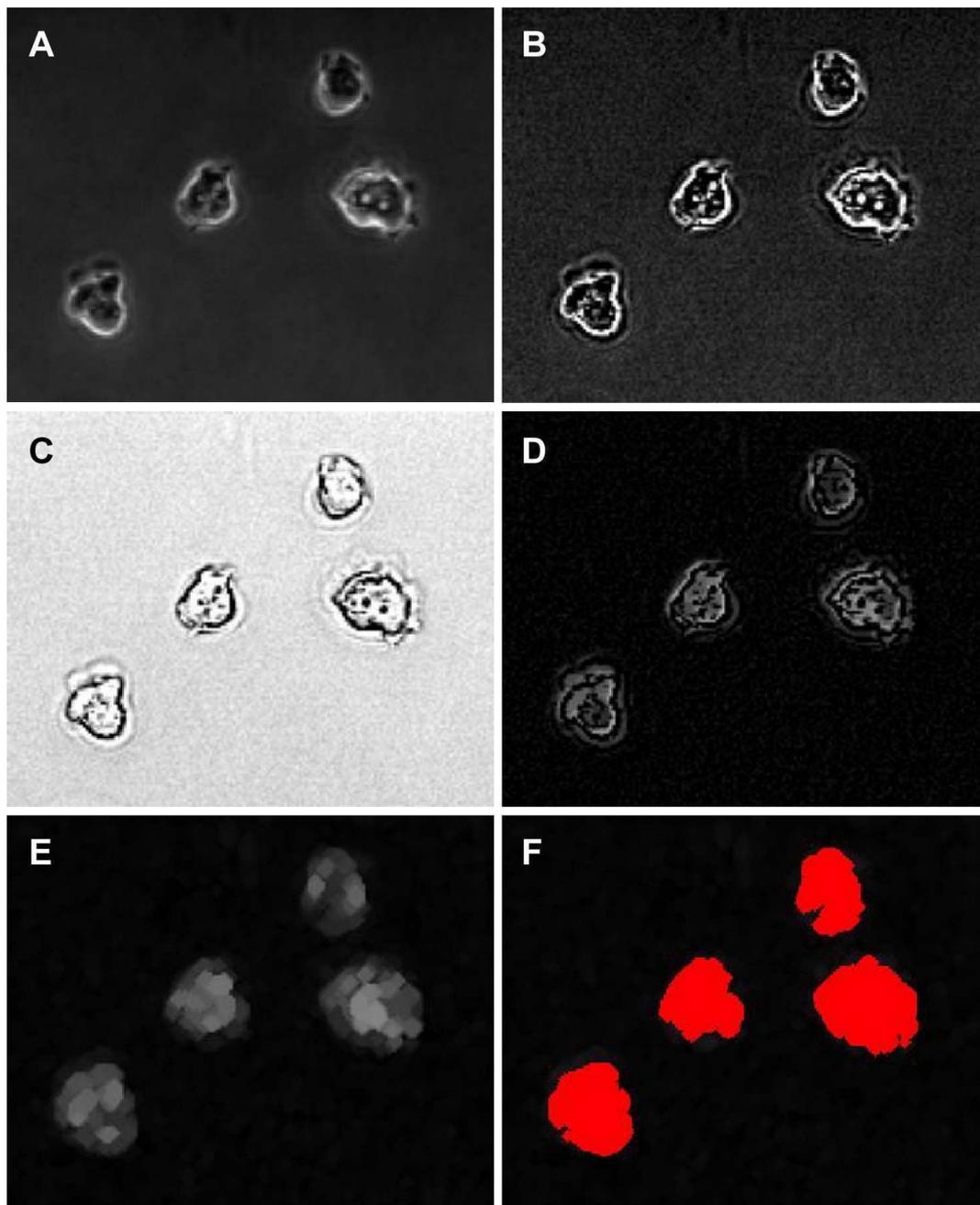


Figure 7_11: Traitement d'images pour l'analyse de films réalisés en x20, Le programme utilisé fait appel à des opérations de traitement d'images couramment utilisées. **A)** Image de contraste de phase, **B)** filtre Unsharp mask, **C)** invert, **D)** Subtract background, **E)** filtres médiane et maximum, **F)** threshold.

La directionnalité du mouvement est caractérisée par l'angle du mouvement cellulaire par rapport à la direction du flux (zéro degré correspond à un mouvement exactement avec le flux, 180° correspond à une cellule qui remonte exactement le flux). Je calcule la vitesse et l'angle du mouvement de chaque cellule en utilisant les coordonnées initiales et finales de son centre de gravité.

7.9.2 Relocalisation de protéines, programme de détection par contours actifs

Pour traiter et analyser les films enregistrés sur le microscope confocal en 100x, le logiciel de traitement d'images ImageJ et différents programmes et macros furent utilisés. En particulier, le programme de détection utilisant des contours actifs, développé, entre autres, par Till Bretschneider (Dormann et al., 2002), m'a beaucoup servi pour quantifier la relocalisation des protéines fluorescentes suite à un changement de sens du flux.

Ce programme repose sur les méthodes de contour actif (Kass et al., 1987). Il utilise une chaîne virtuelle élastique et contractile qui consiste en un certain nombre de nœuds connectés, typiquement 100. Cette chaîne qui joint tous ces nœuds recherche le contour délimitant le plus précisément le contour cellulaire, chaque nœud étant soumis à des forces virtuelles (Dormann et al., 2002). Trois types de forces virtuelles sont exercées sur chaque nœud :

- une « force centrale » qui contracte la chaîne et tire sur le nœud vers le centre de la cellule
- une « force de contraction latérale » qui dépend de la courbure de la chaîne, c'est-à-dire de la position des nœuds voisins et empêche une courbure trop importante
- une « force image » qui dépend de l'information numérique locale, précisément du contraste de l'image. Plus le contour cellulaire est contrasté, plus cette force est grande. Cette force est dirigée vers l'extérieur de la cellule (Fig. 7_12).

Le programme marche par itérations et le contour définitif de la cellule pour une image est trouvé lorsque la vitesse de tous les nœuds, qui tâtonnent d'une itération à l'autre en fonction de la force résultante calculée qui s'exerce sur chacun d'eux, devient inférieure à une vitesse seuil.

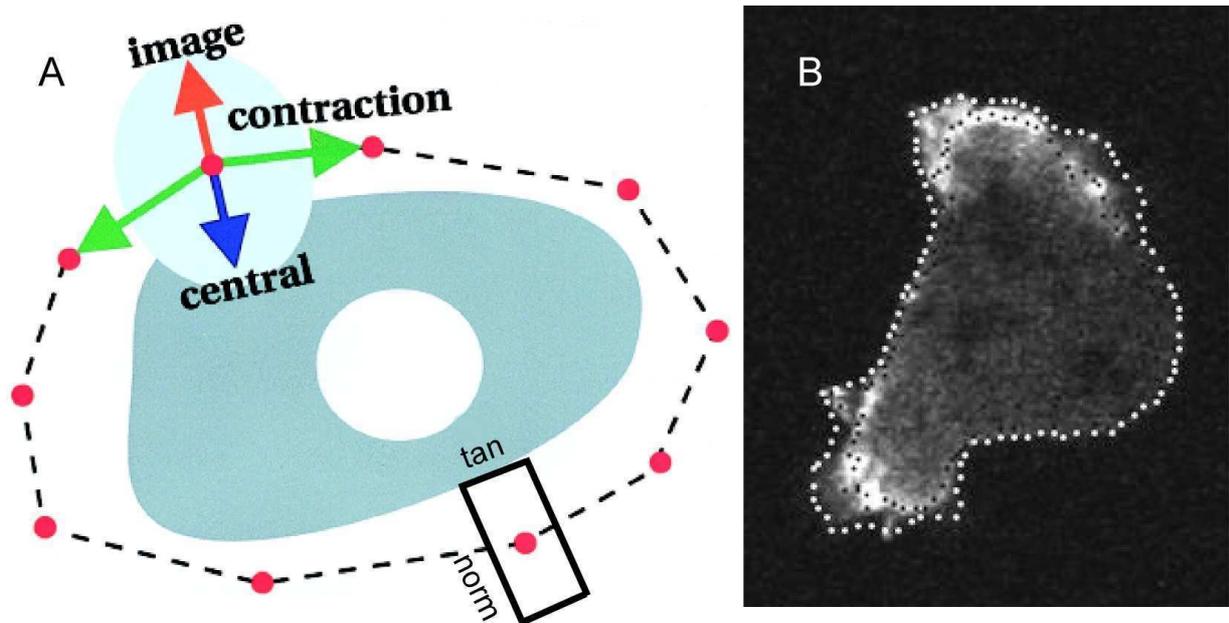


Figure 7_12: **A)** Représentation schématique des trois forces qui s'exercent sur chaque noeud (point rouge) de la chaîne élastique (en pointillés) (tiré de Dormann et al., 2002). **B)** Une cellule *Dictyostelium* marquée à la Lim-GFP. Le contour actif de 100 noeuds (chaîne en pointillés blancs) a trouvé le contour cellulaire.

Afin de trouver ce contour cellulaire, l'analyste doit rentrer les valeurs de paramètres qui permettent d'amplifier ou de diminuer l'influence de chaque force, en fonction de la qualité de l'image à analyser et de la complexité du contour cellulaire. Ces paramètres permettent donc de rendre la chaîne de nœuds plus ou moins contractile, plus ou moins libre de se courber, plus ou moins élastique et donc plus ou moins fidèle au contour cellulaire. Il faut donc trouver le meilleur compromis pour trouver le contour le plus fidèle au contour réel de la cellule. Plus l'image de fluorescence sera bruitée, plus il sera difficile de trouver précisément le contour cellulaire. Les paramètres avec lesquels « joue » l'analyste la plupart du temps sont les suivants (Fig. 7_13) :

- blowup : ce paramètre prend en charge le mouvement global de la cellule et permet au contour de se déplacer « en bloc » plus ou moins loin du contour précédent. Autrement dit, ce paramètre régule l'amplitude de la distance maximale de parcours autorisée aux nœuds lors de leur tâtonnement. Ainsi, plus la cellule bouge d'une image à la suivante, plus il faut augmenter le blowup.
- Sample tan et sample norm (Fig. 7_12) : ces deux paramètres définissent la taille de la fenêtre utilisée au niveau de chaque nœud pour calculer les forces. Ce sont les dimensions tangentielle et normale à la membrane respectivement. Plus on veut une analyse fine des niveaux de gris au niveau de chaque nœud, plus il faut diminuer le sample tan. Si l'image est bruitée, il est préférable d'augmenter le sample tan et le sample norm.

- F central, F contract, F friction, F image : ces paramètres sont des poids qui permettent d'amplifier telle ou telle force. F friction est une force visqueuse. Par exemple, si le contraste est faible, la force image a tendance, par définition, à être faible et il arrive que le contour s'effondre à l'intérieur de la cellule du fait de la force centrale. L'analyste peut alors augmenter le paramètre F image pour augmenter la force image. Pour éviter d'avoir des boucles dans le contour, on peut augmenter F contract pour tendre la chaîne. Un autre moyen d'éviter les boucles en les supprimant est de rentrer la valeur 1 dans « cut loops every ».
- Sensitivity : le plus faible ce paramètre, le plus aisément chaque nœud reconnaîtra une différence de gris et donc l'intérieur de l'extérieur de la cellule. Réduire ce paramètre en dessous de 0,3 donne lieu à des contours aberrants.
- Sampling : ce paramètre est le nombre de nœuds que l'analyste veut avoir sur chaque contour. Plus on veut une précision importante, plus il faut échantillonner le contour et plus les calculs informatiques sont longs. Ce choix dépend naturellement de la taille de l'objet étudié. Un contour avec 100 nœuds pour des cellules de taille typique 10 μm permet d'obtenir une bonne précision (environ 0,3 μm entre deux nœuds successifs).

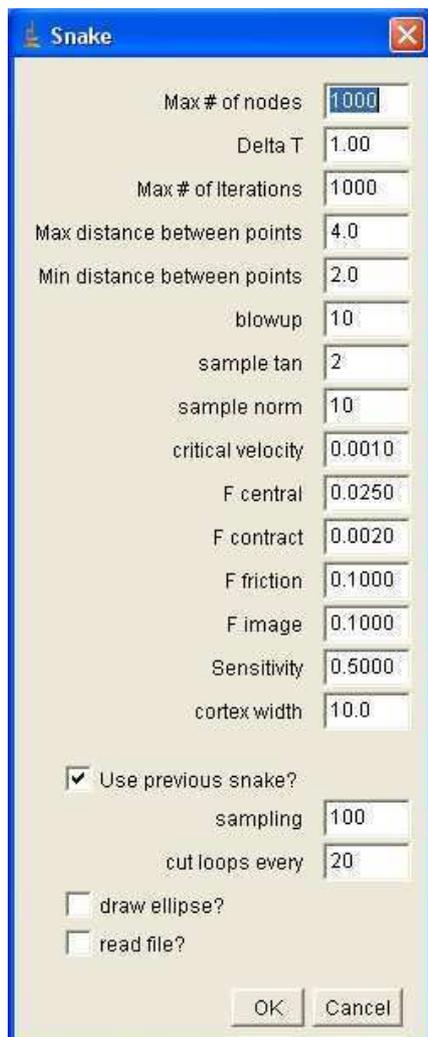


Figure 7_13: Interface du programme de contour actif dans le logiciel Image J. C'est dans cette fenêtre que l'analyste rentre les paramètres définis ci-dessus.

Une fois que le contour cellulaire est trouvé, la chaîne qui définit ce contour est alors contractée d'une certaine distance choisie par l'analyste avec le paramètre « cortex width » exprimé en pixels, ce qui donne naissance à une seconde chaîne (chaîne bleue représentée dans la Figure 7_14). L'intensité de fluorescence moyenne est alors mesurée à l'intérieur de cette seconde chaîne intérieure qui définit grossièrement la frontière entre le cortex et le cytoplasme. Cette mesure d'intensité est donc l'intensité du corps cellulaire, ou l'intensité du fond de fluorescence cellulaire et servira de référence.

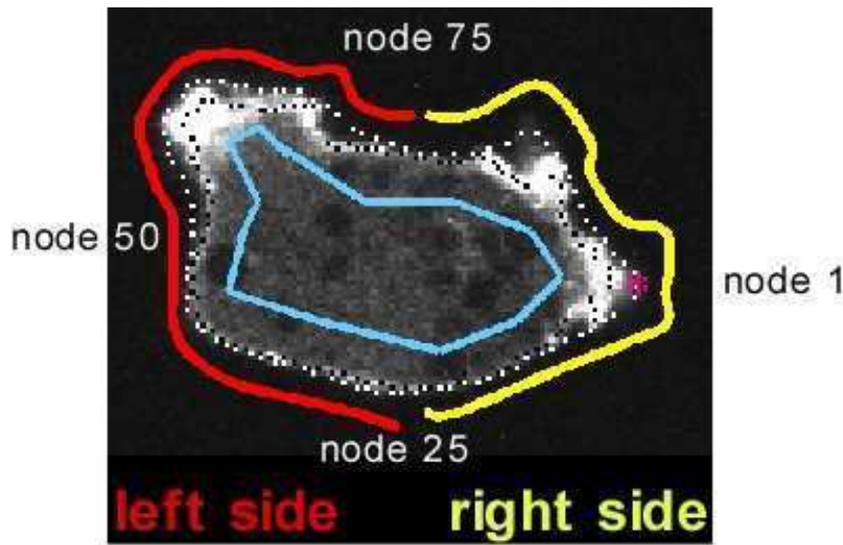


Figure 7_14: Représentation des différentes chaînes qui interviennent dans le programme de détection par contour actif. Cellule marquée à la Lim-GFP. La chaîne pointillée noire est la chaîne qui relie les maxima locaux d'intensité de fluorescence (on peut aussi voir cette chaîne sur l'exemple de la Figure 7_12_B). Le noeud le plus à droite (astérisque rose) garde en permanence le numéro 1 (les noeuds sont numérotés de 1 à 100).

La localisation précise de la membrane cellulaire (ou plutôt du cortex) est ensuite identifiée en trouvant le maximum local d'intensité sur la ligne qui relie un nœud de la chaîne extérieure (contour cellulaire) au nœud correspondant de la chaîne intérieure contractée.

Pour mon travail de thèse, j'ai mesuré les ratios de fluorescence entre l'intensité de fluorescence du cortex et celle du cytoplasme. Pour obtenir ce ratio, au niveau d'un nœud, le maximum local d'intensité sur la membrane (cortex) est divisé par l'intensité moyenne du cytoplasme, qui sert donc de référence. Cela permet de visualiser l'augmentation de fluorescence comparée au niveau de fluorescence du corps cellulaire et donc de visualiser le recrutement de protéines fluorescentes au niveau du cortex.

Mon but étant de quantifier le phénomène de relocalisation de protéines d'un côté au côté opposé de la cellule suivant un changement de sens du flux, l'analyse a consisté à diviser la cellule en deux moitiés : une moitié face au flux et une moitié du côté aval de l'écoulement.

Ainsi, il a été possible de mesurer les cinétiques de relocalisation de protéines fluorescentes, en gardant fixe le nombre de nœuds (égal à 100), en numérotant 1 le nœud le plus à droite du contour cellulaire et en divisant virtuellement la cellule en deux moitiés : une moitié du nœud 26 au nœud 75 (moitié gauche) et une moitié du nœud 76 au nœud 24 (moitié droite de la cellule; voir Fig. 7_14). Pour chaque moitié, le ratio de fluorescence moyen a été mesuré et comme l'axe du flux était toujours dirigé le long d'une ligne horizontale, ces ratios de fluorescence étaient donc moyennés le long de la moitié exposée au flux et le long de la moitié non exposée au flux.

Ce programme de détection utilisant des contours actifs permet de mesurer de nombreux paramètres cellulaires tels les coordonnées de chaque nœud, l'élongation cellulaire, l'intensité de fluorescence moyenne du corps cellulaire, la distribution de fluorescence le long du cortex et fut particulièrement efficace dans le cadre de ce travail. On définit l'élongation de la manière suivante :

$$\text{élongation} = \log_2(a/b),$$

où a et b sont le grand et le petit axe respectivement.

D'autre part, ce programme permet aussi de visualiser quantitativement l'orientation cellulaire comparée à la direction du flux au moyen de graphes polaires (polar plots). Un graphe polaire est une représentation pratique qui permet de capturer simultanément les dynamiques spatiales et temporelles concernant le paramètre d'intérêt mesuré sur le contour cellulaire. Pour chaque point temporel d'une série d'images, le contour cellulaire est représenté par un cercle et tous les cercles successifs correspondant à tous les points temporels de la série sont arrangés comme les anneaux d'un tronc d'arbre avec le contour initial au centre et le contour final en bordure du tronc, de telle manière que le temps évolue le long de chaque rayon de ce graphe en forme de disque, en partant de l'intérieur du disque jusqu'au dernier cercle caractérisé par le plus grand rayon. Comme il a été choisi un nombre de nœuds égal à 100 avec le nœud le plus à droite gardant en permanence le numéro 1, la position sur chaque contour circulaire de ces 100 nœuds équidistants (qui sont les 100 points de mesure) permet une représentation angulaire tout autour de la cellule (voir un exemple de graphe polaire dans la Figure 9_3 dans la partie *Résultats*). Pour notre étude, le ratio de fluorescence de la protéine d'intérêt était le paramètre mesuré tout autour de la cellule. Ainsi, l'utilisation des graphes polaires donne une visualisation quantitative et compacte des variations temporelles de la distribution de fluorescence des protéines d'intérêt tout autour des cellules vivantes. Pour réaliser des analyses statistiques, il est possible de moyenniser les graphes polaires de plusieurs cellules.

Pour faciliter la comparaison entre cinétiques de relocalisation obtenues avec différentes souches cellulaires ou avec la même souche soumise à différentes conditions expérimentales, il est pratique de tracer les ratios de fluorescences normalisés, exprimés en pourcentages, ou plutôt la croissance des ratios de fluorescence. Pour ce faire, la formule suivante fut utilisée :

$$\text{ratio (en \%)} = \text{croissance du ratio} = [(\text{ratio}-m)/(M-m)]*100$$

où M et m sont les valeurs moyennes du ratio sur une fenêtre de temps localisée sur les plateaux haut et bas respectivement (voir les courbes dans la partie *Résultats*). Dans le texte, ce que j'appelle « temps caractéristique » pour une courbe de décroissance ou de croissance est défini comme le temps nécessaire pour atteindre 33 % ou 66 % de l'amplitude de variation maximale (différence entre les plateaux haut et bas), pour une décroissance ou une croissance respectivement.

Pour la quantification de la fluorescence de la GFP-myo-II, les clusters de GFP-myo-II cytoplasmiques et les vésicules (qui montrent une grande diminution de l'intensité de fluorescence de la GFP-myo-II) ont été exclus pour mesurer l'intensité moyenne du corps cellulaire.

7.9.3 Quantification de la rétraction du bord cellulaire

Pour quantifier les mouvements de rétraction de l'arrière de la cellule, les images de fluorescence de la GFP-myo-II ont été utilisées. L'axe de la rétraction est d'abord défini comme l'axe joignant deux points, de coordonnées $(x_{\text{axis}}, y_{\text{axis}})$ et $(x_{\text{axis0}}, y_{\text{axis0}})$, situés aux positions arrière extrêmes, respectivement au début et à la fin du processus de rétraction dépendant de la myosine-II. A un temps t, les coordonnées $(x_{\text{rear}}, y_{\text{rear}})$ de l'arrière de la cellule sont ensuite mesurées comme la moyenne des coordonnées des nœuds situés au côté arrière (entre 3 et 15 nœuds de l'arrière de chaque cellule ont été utilisés pour mesurer ces coordonnées moyennes). Ensuite, pour chaque point temporel, la position de l'arrière est projetée sur l'axe de la rétraction. Pour ce faire, la relation suivante fut utilisée :

$$\text{Position}_{\text{(arrière/axe de rétraction)}} = ((x_{\text{rear}}-x_{\text{axis}})^2 + (y_{\text{rear}}-y_{\text{axis}})^2)^{1/2} * \cos[\text{Arctan}((y_{\text{rear}}-y_{\text{axis}})/(x_{\text{rear}}-x_{\text{axis}})) - \text{Arctan}((y_{\text{axis}}-y_{\text{axis0}})/(x_{\text{axis}}-x_{\text{axis0}}))],$$

L'origine de cet axe, le point de coordonnées $(x_{\text{axis0}}, y_{\text{axis0}})$, est déterminée pour chaque cellule de telle manière que le déplacement minimum de l'arrière est égal à zéro. L'orientation

de chaque axe est choisie de sorte que le déplacement croît lorsque la cellule rétracte après s'être réorientée contre le nouveau flux (voir Figure 9_9_C dans la partie *Résultats*). Pour obtenir la courbe moyenne de rétraction, les déplacements de l'arrière de 16 cellules ont été moyennés.

Les programmes utilisés pour toutes ces analyses ont été développés sous ImageJ (ImageJ plugin, version ImageJ 1.25f, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) et un ensemble de macros ont servi à la visualisation (Open Visualization Data Explorer (4.1.0, <http://www.opendx.org>) macros). Les données de sortie sont écrites en format ASCII et ensuite utilisées pour les calculs sous le logiciel libre Octave (<http://www.octave.org>). Enfin, les courbes sont tracées sous Excel.

VIII Résultats, première partie : Mise en évidence de plusieurs motilités cellulaires sous flux

Le travail de cette thèse est un travail de collaboration entre deux laboratoires : le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (du Département de Réponse et Dynamique Cellulaire du CEA-Grenoble) dirigé par Michel Satre, et le groupe de recherches sur la dynamique du cytosquelette dirigé par Günther Gerisch du Max-Planck Institute of Biochemistry situé à Martinsried (Allemagne).

Comme tout travail de collaboration, ce projet m'a amené à réaliser des expériences dans chacun des laboratoires et à observer des souches cellulaires différentes habituellement utilisées dans chaque endroit.

Ainsi, j'ai réalisé des expériences sous flux avec des AX2 conservées à Grenoble (clone C1/3), des AX2 conservées à Martinsried (clone # 2-14), des JH10 conservées à Martinsried (JH10 généreusement données par Hans Warrick), des NC4a conservées à Martinsried. Outre les types cellulaires différents, j'ai étudié, sur un même type cellulaire, l'influence

- des conditions de culture (en particulier, de l'ancienneté des cultures)
- de l'induction du programme de développement cellulaire

sur le comportement des cellules en réponse à un flux hydrodynamique.

8.1 Effet des conditions de culture cellulaire sur la motilité induite par un flux

Sans aucun stimulus, les cellules *Dictyostelium discoideum* adhérant à un substrat de verre migrent aléatoirement dans toutes les directions du plan du substrat (migration isotrope) à des vitesses d'environ 2-5 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Il a été montré que les cellules *Dictyostelium* répondaient à un stimulus mécanique exercé à l'aide d'un flux hydrodynamique (Décavé et al., 2003 ; Fache et al., 2005). En effet, ces cellules migrent principalement dans la direction d'un flux correspondant à une contrainte de cisaillement de plus de 1 Pa et leurs vitesses sont accrues par rapport à la situation sans flux. Des expériences sous un flux de 2,3 Pa donnent typiquement les courbes de la Figure 8_1 pour les vitesses et la directionnalité du mouvement cellulaire. Le pourcentage de

détachement des cellules du substrat se situe typiquement entre 30 et 60 % en 10 minutes d'application d'un flux de 2,3 Pa.

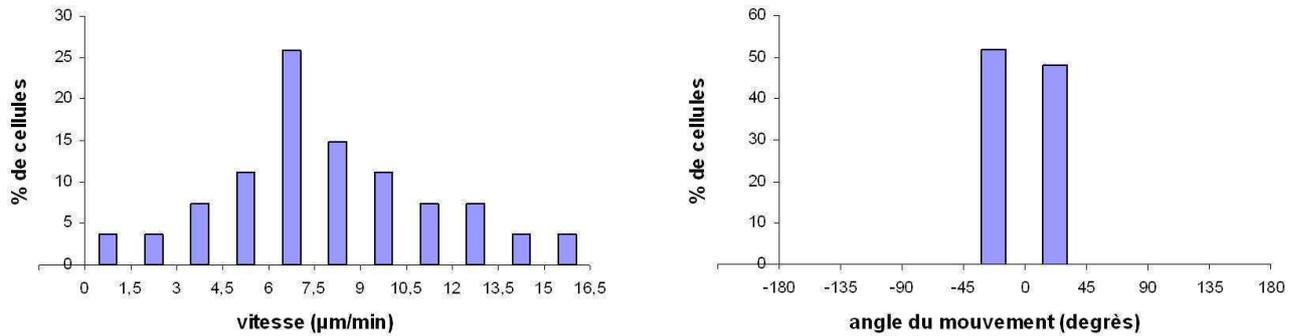


Figure 8_1: Distributions (A) des vitesses et (B) des angles (mesurés par rapport à la direction du flux qui correspond à 0°) du mouvement de cellules AX2 de Grenoble (clone C1/3) adhérant à un substrat de verre et soumises à un flux de 2.3 Pa.

Cependant, à mon arrivée à Martinsried, j'ai remarqué que les cellules AX2 conservées par le groupe de Günther Gerisch (clone 2-14) ne se comportaient pas de la même manière sous flux. En effet, ces cellules montrent un taux de détachement supérieur (moyenne de 76 +/- 12 % sur 9 expériences indépendantes) et une migration réduite avec des vitesses bien plus faibles (Fig. 8_2_C). Ces cellules ne montrent pas de claire orientation par rapport à la direction du flux (du fait de leurs faibles vitesses et de leur fort détachement), mais une majorité d'entre elles sont déplacées par le flux dans sa direction, ce qui explique la distribution des angles associée (Fig. 8_2_D). En observant en grossissement 20x ces cellules (Fig. 8_2_E et F), il apparaît que grossièrement entre 60 et 80 % des cellules soumises à l'application d'un flux de 2,3 Pa depuis plusieurs minutes émettent des protrusions contre le flux (les 60-80 % de cellules qui émettent des protrusions contre le flux à un temps t_1 ne sont pas forcément les cellules qui émettent des protrusions contre le flux à un temps t_2 , mais cette proportion est à peu près constante et reste dans cette gamme).

Pour comprendre l'origine de cette différence de comportement entre cellules AX2 de Grenoble (notées AX2G) et cellules AX2 de Martinsried (notées AX2M), une première piste était, selon moi, de vérifier l'existence d'éventuelles différences dans la façon de cultiver les cellules. J'ai donc répertorié les habitudes de culture cellulaire utilisées dans chaque laboratoire (Tableau 8_1).

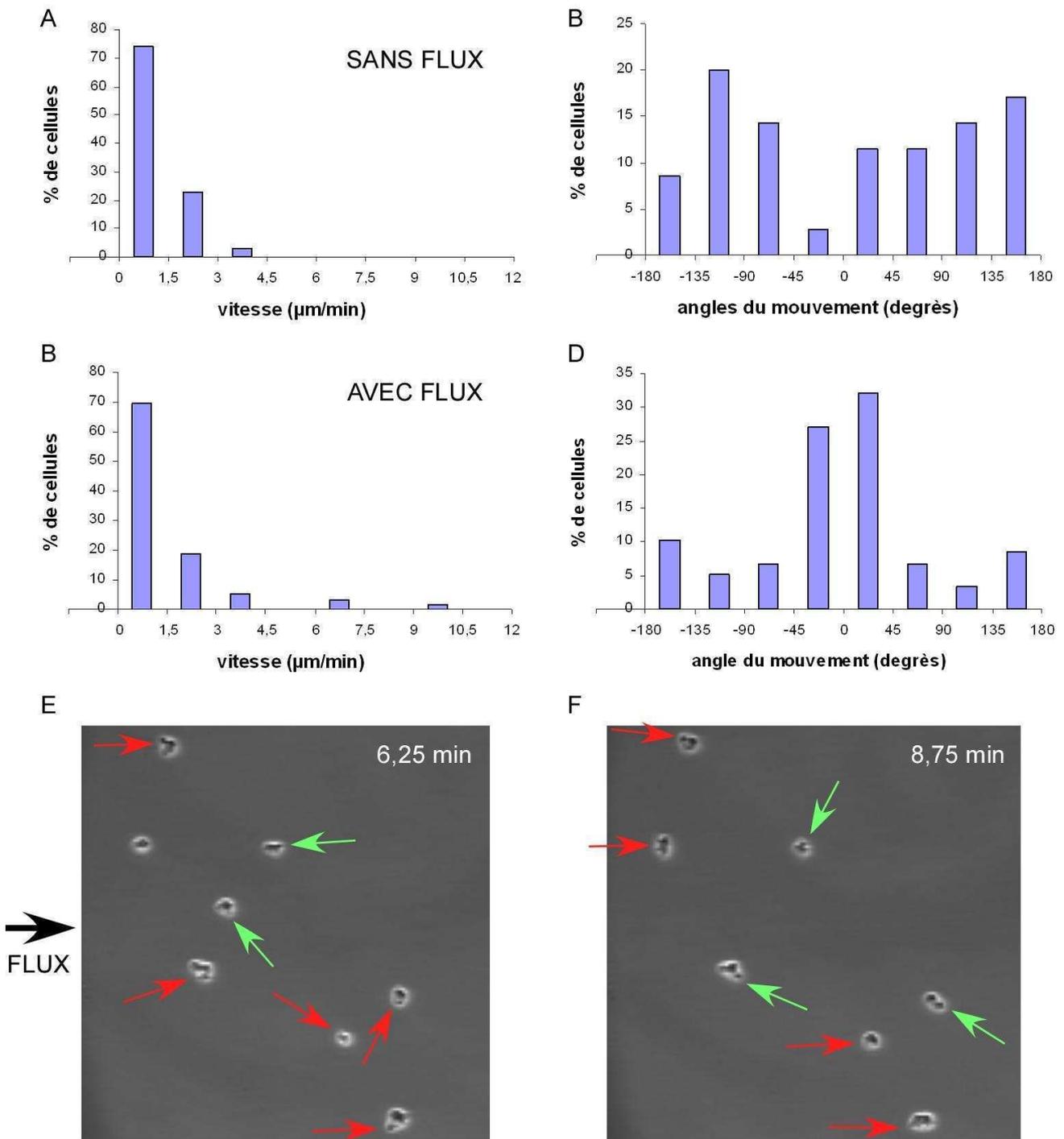


Figure 8_2: Distributions (A) des vitesses et (B) des angles du mouvement de cellules AX2 de Martinsried (clone 2-14) adhérant à un substrat de verre et non stimulées.

Distributions (C) des vitesses et (D) des angles du mouvement de cellules AX2 de Martinsried (clone 2-14) adhérant à un substrat de verre et soumises à un flux de 2.3 Pa.

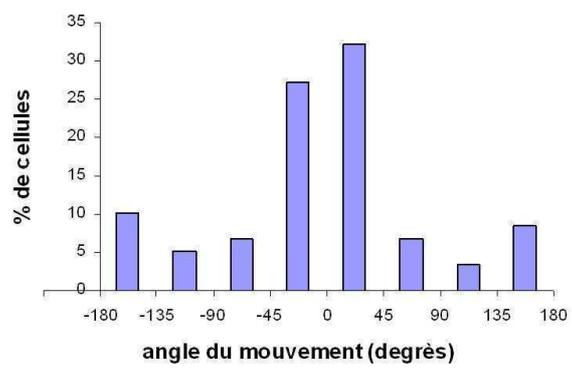
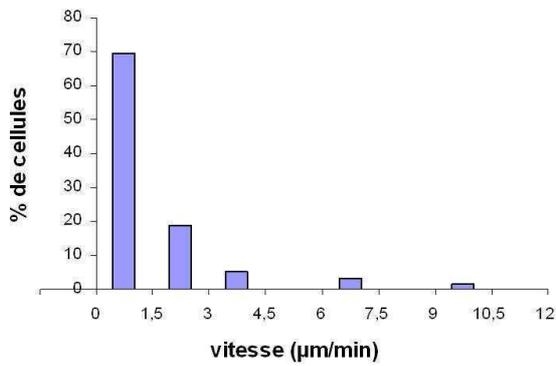
E et F Deux images d'un film de cellules AX2 de Martinsried (clone 2-14) adhérant à un substrat de verre et soumises à un flux de 2.3 Pa. La durée d'application du flux est indiquée en minutes. Les flèches rouges indiquent les cellules qui protrudent contre le flux. Les flèches vertes, celles qui protrudent dans la direction du flux. A un temps t fixé, une majorité de cellules (entre 60 et 80 %) protrudent contre le flux. Une cellule est ronde à 6,25 minutes. Une cellule a décollé entre les deux prises d'images.

	Grenoble AX2-G	Martinsried AX2-M
Provenance des cellules	Clone C1/3, clone obtenu de Günther Gerisch	Clone ≠ 2-14, clone sélectionné pour son développement rapide, à partir de cellules AX2 obtenues de J. Ashworth, mutées et reclonees par Günther Gerisch.
Milieu de culture	Même milieu que celui décrit dans « <i>Matériels et Méthodes</i> » auquel on rajoute 0,25 g/L de dihydrostreptomycine sulfate.	Milieu décrit dans la section « <i>Matériels et Méthodes</i> » (pas d'ajout d'antibiotique).
culture agitée versus en boîte	Habituellement cultures agitées pour les expériences sous flux (180 rpm).	Habituellement cultures sur boîtes. Cultures agitées (150 rpm) utilisées seulement pour avoir des cellules en grandes quantités.
Temps de maintien des cellules en culture	Entre 3 et 12 semaines.	Temps de culture limité à 10-15 jours. Nouvelle culture d'AX2 chaque semaine à partir d'un stock de spores.
Température de culture	22 +/- 1 °C	22 +/- 1 °C
Lavage des récipients rentrant en contact avec les cellules	Détergent/soude/acide/eau distillée	Avec un détergent spécial ¹ utilisé pour ses propriétés non toxiques sur les cultures cellulaires.

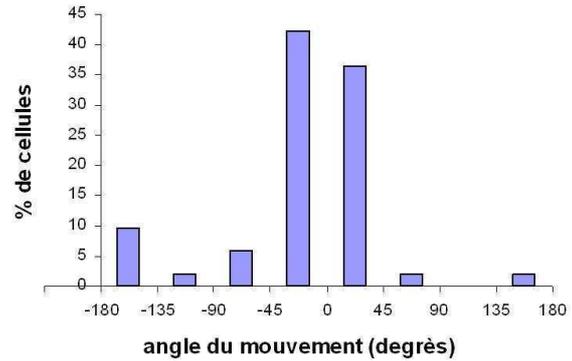
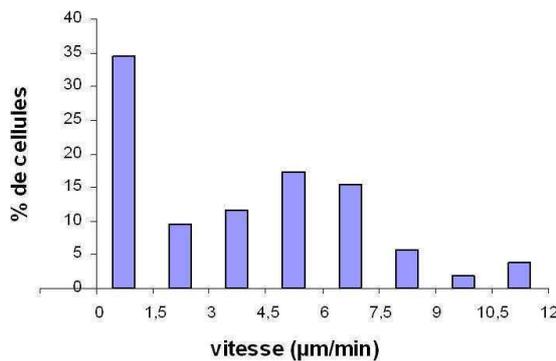
Tableau 8_1: Habitudes de culture cellulaire utilisées dans les laboratoire de Grenoble et de Martinsried.

Au vu de ces différences, il a semblé que le paramètre qui pouvait avoir le plus d'impact sur la réponse motile au flux était probablement le temps de culture des cellules. J'ai donc cultivé des cellules AX2M pendant des périodes de temps plus longues (jusqu'à deux mois) afin de vérifier leur comportement sous flux en fonction de l'âge de la culture (Fig. 8_3).

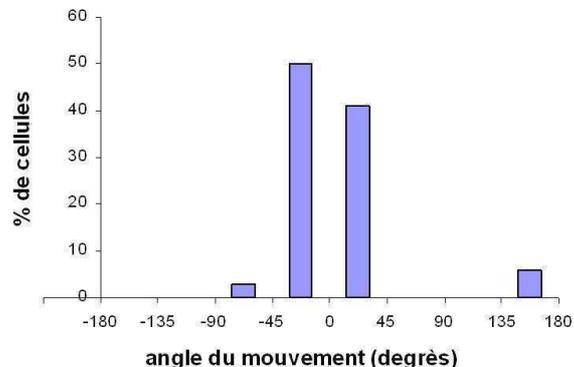
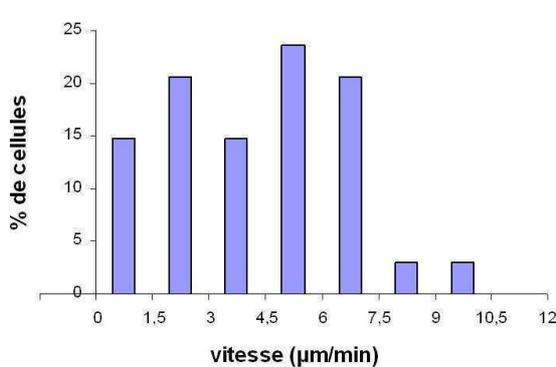
¹ Détergent : Deconex de chez Borer Chemie, réf. 21 CLF



A) Cellules AX2-M de cultures conservées moins de deux semaines (sous agitation ou en boîte) (59 cellules observées dans 9 expériences). Moyenne de détachement de 76 +/- 12 % en 10 min sous un flux de 2,3 Pa.



B) Cellules AX2-M de cultures conservées entre un et deux mois dont 2 à 6 semaines sous agitation (52 cellules de 4 expériences). On a alors un plus faible détachement (moyenne de 28 +/- 28 % de cellules détachées en 10 minutes sous un flux de 2,3 Pa).



C) Cellules AX2-M de cultures conservées deux mois dont 7 à 8 semaines en culture agitée. Moyenne de détachement de 33 +/- 5 % (34 cellules de 2 expériences).

Figure 8_3: Evolution de la réponse motile sous un flux de 2,3 Pa en fonction de l'ancienneté des cultures de cellules AX2 Martinsried (clone 2-14).

On observe une évolution avec le temps du comportement cellulaire sous flux. En particulier, la distribution des vitesses de cellules en culture entre un et deux mois dont 2 à 6 semaines sous agitation (Fig. 8_3_B) montre que la population n'est pas homogène avec a priori deux populations cellulaires dont l'une migre plus vite que les cellules cultivées moins de deux semaines. De plus, on observe que plus le temps passé en culture augmente, plus la proportion de cellules avançant rapidement (vitesses supérieures à 3 µm/min) avec le flux est

grande et plus le mouvement est dirigé dans la direction du flux. Un autre aspect concerne l'adhésion cellulaire. Pour des cellules cultivées plus d'un mois en culture agitée, le taux de détachement en 10 minutes sous un flux de 2,3 Pa est réduit à 22 +/- 11 %. Cela suggère fortement que l'agitation des cultures cellulaires sur une période de l'ordre du mois entraîne une plus grande adhésion des cellules au substrat de verre.

On peut noter que l'agitation des cellules semble nécessaire à cette évolution du comportement motile sous flux. En effet, des cellules cultivées un mois en boîte de Pétri montrent un taux de détachement de 72 % (une expérience) et des vitesses de l'ordre du $\mu\text{m}/\text{min}$. On a donc un comportement sous flux de ces cellules similaire à celui de cellules cultivées moins de deux semaines.

Pour vérifier la reproductibilité de cette évolution du comportement cellulaire sous flux avec le temps passé en culture, j'ai utilisé trois cultures cellulaires faites à partir de spores et ai observé la même évolution. De plus, j'ai aussi testé ces cellules AX2M à Grenoble avec les conditions cellulaires utilisées à Grenoble. Les expériences réalisées dans les trois premières semaines suivant la réception des cellules à Grenoble ont montré un phénotype similaire à celui observé avec les cellules de moins de deux semaines (fort détachement, peu de mouvement). Cependant, en laissant les cellules en culture agitée plus de deux mois, j'ai à nouveau observé un mouvement à grandes vitesses avec le flux de ces cellules.

Conclusion : nous avons mis en évidence un nouveau comportement des cellules *D. discoideum* en réponse à un flux hydrodynamique. Il se caractérise par une activité de protrusion exercée contre le flux qui conduit à une quasi-absence de mouvement du centre de masse, et un taux de détachement accru. Le temps passé en culture agitée influe sur le comportement cellulaire sous flux. Plus une culture agitée est conservée sur une période de temps longue, plus les cellules sont adhérentes et migrent rapidement dans le sens du flux. Dans la suite, nous avons appelé le premier comportement « résistance au flux hydrodynamique » et le second « motilité induite par un flux ».

8.2 Effet du flux hydrodynamique sur la motilité de cellules non-axéniques NC4a

Les cellules AX2 ayant été obtenues par Watts et Ashworth (1970) par sélections successives à partir d'une souche antérieure (NC4a) de manière à isoler un clone qui puisse croître dans un milieu nutritif axénique simplifié, ces cellules contiennent plusieurs mutations permettant la croissance dans un tel milieu (Williams et al., 1974 ; North and Williams, 1978).

Au vu de la différence de comportement sous flux des AX2 de Grenoble et de Martinsried, il semblait donc important de vérifier le comportement sous flux des cellules *Dictyostelium discoideum* NC4a. Ces cellules ne croissent pas en milieu axénique et sont cultivées sur un gel recouvert de bactéries qu'elles phagocytent. On a donc un front cellulaire qui se propage avec le temps au fur et à mesure que les bactéries sont consommées. Juste derrière le front, les cellules privées de nourriture commencent leur cycle de développement et forment des courants d'agrégation et au centre de la plaque de gel, les cellules privées de nourriture depuis plus longtemps forment déjà des slugs et des spores (Fig. 8_5_A).

Afin de tester sous flux ces cellules NC4a dans leur phase végétative, j'ai récupéré des cellules sur une plaque en prenant soin de ne prendre des cellules que sur le front de croissance (Fig. 8_5_A). Ces cellules se comportent sous flux comme les cellules AX2 de Martinsried cultivées moins de deux semaines, avec de faibles vitesses (moyenne de 1,1 +/- 0,7 $\mu\text{m}/\text{min}$), un fort détachement (75 +/- 3 %) et une dérive passive avec le flux d'une majorité de cellules (Fig. 8_4).

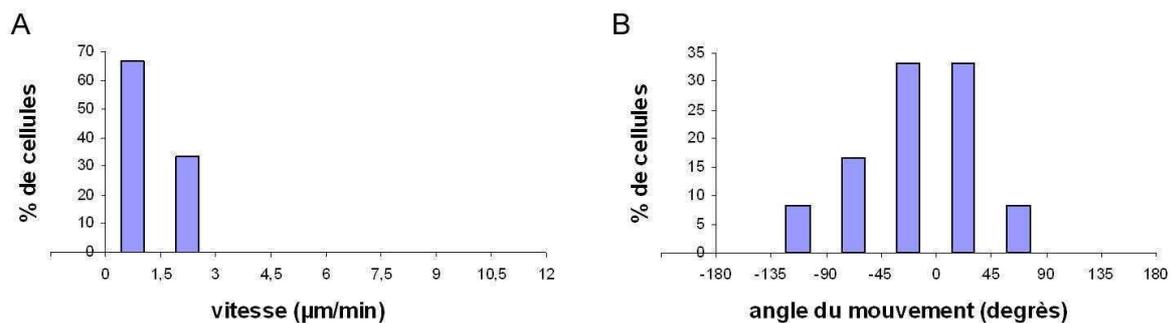


Figure 8_4: Distributions (A) des vitesses et (B) des angles du mouvement de cellules NC4a végétatives (prélevées sur le front de croissance) sur un substrat de verre et sous un flux de 2,3 Pa.

Un des intérêts de l'organisme *Dictyostelium discoideum* est qu'il présente deux modes de motilité déjà établis et distincts selon l'état de développement cellulaire. Lorsque les cellules sont végétatives et non stimulées, celles-ci migrent aléatoirement à des vitesses d'environ 2-5 $\mu\text{m}/\text{min}$ avec des morphologies assez rondes et une surface de contact avec le substrat importante (de l'ordre de 90 μm^2 sur un substrat de verre recouvert de BSA ; Weber et al., 1995). Lorsque les cellules sont agrégation-compétentes (voir un protocole pour obtenir des cellules agrégation-compétentes dans « Cellules en milieu non nutritif » de *Matériels et Méthodes*), elles sont très allongées et migrent rapidement (environ 10-12 $\mu\text{m}/\text{min}$) vers une source d'AMPc. Elles ont alors une faible surface totale de contact (environ 5 fois plus faible, de l'ordre de 20 μm^2) qui peut se diviser en plusieurs aires de contact avec le substrat (Weber et al., 1995 ; voir Figure 6_23). Ces auteurs avaient alors émis l'hypothèse que l'énergie

d'adhésion cellule-substrat de ces cellules agrégatives devait être inférieure à celle des cellules végétatives.

En étudiant le comportement sous flux des cellules NC4a, j'ai aussi remarqué en prélevant des cellules trop à l'intérieur du front de cellules végétatives qu'il était possible de récupérer des cellules avançant rapidement avec le flux.

J'ai donc effectué des expériences sous un flux de 2,3 Pa en prélevant des cellules NC4a au niveau des courants d'agrégation (entre le front de cellules végétatives et la région contenant des spores sur tiges ; Fig. 8_5_A). Ces cellules ont clairement commencé leur développement et pour environ 50 % d'entre elles présentent des morphologies très allongées typiques de cellules agrégation-compétentes (Fig. 8_5_B).

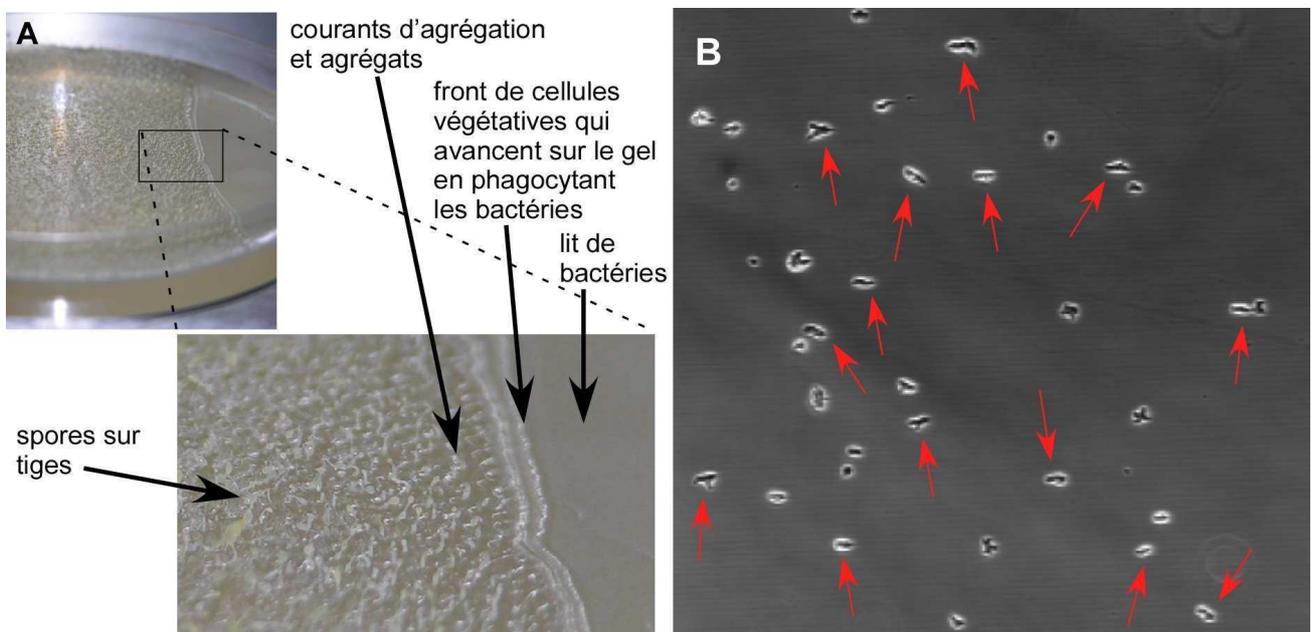
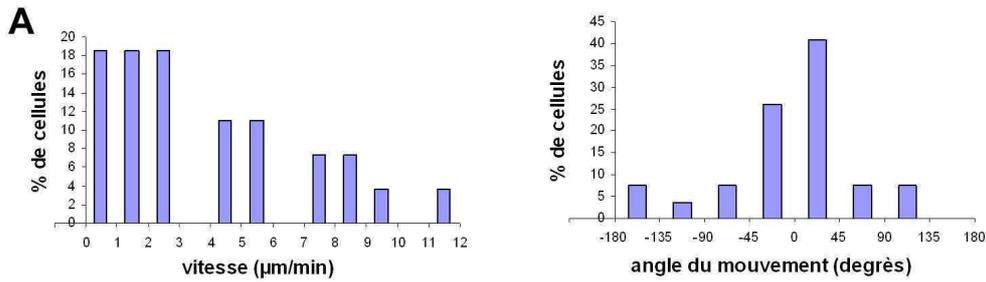


Figure 8_5: A) Propagation d'un front de cellules NC4a phagocytant des bactéries recouvrant initialement toute la surface du gel d'agar. **B)** Image en contraste de phase de cellules NC4a prélevées au niveau des courants d'agrégation (entre le front de cellules végétatives et la région contenant des spores sur tiges). Ces cellules présentent des morphologies très allongées (flèches rouges) typiques de cellules agrégation-compétentes.

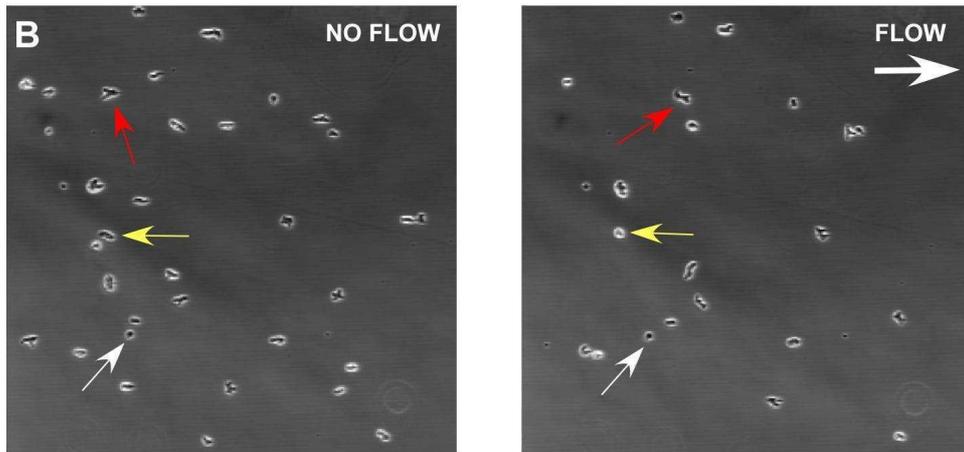
40 % d'entre elles migrent rapidement (vitesse supérieure à $3 \mu\text{m}/\text{min}$) dans la direction du flux. La vitesse moyenne sur toutes les cellules vaut $3,9 \pm 3,2 \mu\text{m}/\text{min}$ (mesure de vitesses sur 27 cellules de deux expériences indépendantes ; Fig. 8_6_A) et le pourcentage de détachement sur toutes les cellules en 10 minutes et sous 2,3 Pa est de $47,5 \pm 7,8 \%$.

En observant la morphologie des cellules avant l'application du flux et sous flux, deux catégories de cellules apparaissent : celles qui conservent leur forme allongée sous flux et celles qui, au contraire, adoptent sous flux une forme arrondie, typique des cellules végétatives, indépendamment de leur forme, allongée ou ronde, avant l'application du flux

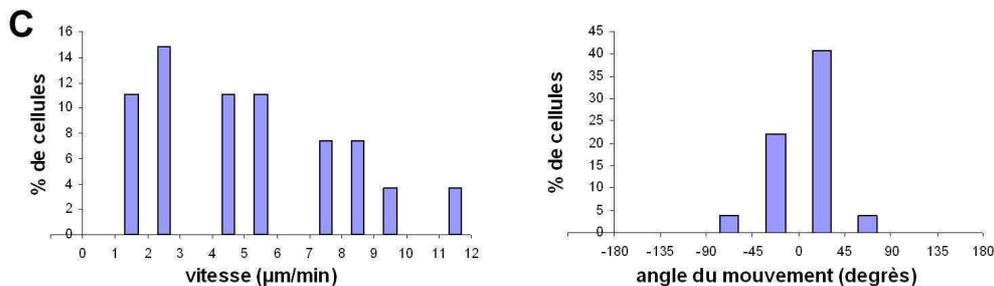
(Fig. 8_6_B). On peut donc redessiner les distributions des vitesses et de la directionnalité du mouvement cellulaire en séparant ces deux populations (Fig. 8_6_C et D).



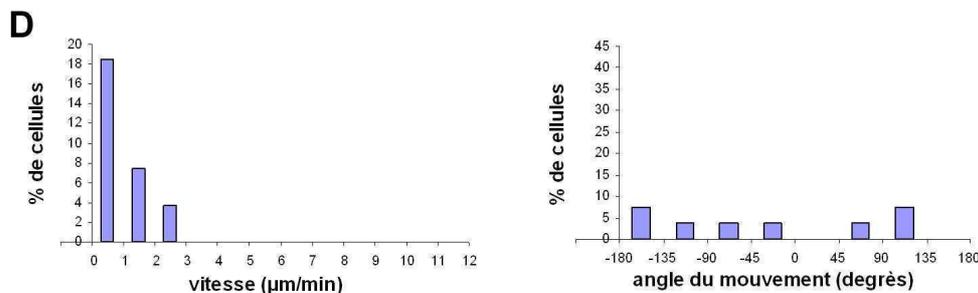
A) Distributions des vitesses et des angles du mouvement pour des NC4a prélevées dans les courants d'agrégation et soumises à un flux hydrodynamique de 2,3 Pa pendant 10 minutes.



B) Images de contraste de phase avant l'application du flux (NO FLOW) et après 7 minutes d'application d'un flux de 2,3 Pa (FLOW; la grosse flèche indique la direction du flux). On observe deux catégories de cellules : les cellules qui conservent leur forme allongée sous flux (flèche rouge), et celles qui montrent une forme arrondie/compacte sous flux, indépendamment de leur forme, allongée (flèche jaune) ou ronde (flèche blanche), avant l'application du flux.



C) Distributions des vitesses et des angles pour les NC4a qui conservent leur forme allongée sous flux (pourcentages exprimés sur le nombre total de cellules).



D) Distributions des vitesses et des angles pour les NC4a qui montrent une forme arrondie sous flux quelque soit leur forme initiale.

Figure 8_6: Parmi les NC4a des courants d'agrégation, on peut distinguer deux catégories de cellules qui montrent deux phénotypes distincts de motilité sous flux.

Il apparaît donc deux catégories de cellules qui montrent deux phénotypes distincts de motilité sous flux :

- 60 % des cellules adoptent sous flux une forme ronde/compacte et émettent principalement des protrusions contre le flux. Ces cellules migrent lentement (vitesse moyenne de $0,9 \pm 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$ mesurée sur les cellules qui adhèrent pendant tout le film de 10 minutes). Bien qu'étant principalement orientées contre le flux, leur mouvement apparent est aléatoire (Fig. 8_6_D). Ces cellules sont caractérisées par un fort détachement (71 % de cellules détachées en 10 minutes sous 2,3 Pa).
- 40 % des cellules restent allongées et migrent activement et rapidement avec le flux (moyenne des vitesses de $5,1 \pm 3,1 \mu\text{m}/\text{min}$). Ces cellules restent sur le substrat plus longtemps (9 % de détachement en 10 minutes sous 2,3 Pa).

On peut donc supposer que l'on a deux populations de cellules dans ces cellules prélevées dans les courants d'agrégation sur gel recouvert initialement de bactéries :

- 1) une population de cellules qui se comportent sous flux quasi comme des cellules végétatives (faibles vitesses et fort détachement proches de ceux obtenus avec les NC4a végétatives), même si elles semblent mieux résister à l'entraînement par le flux que les cellules végétatives (comparez les distributions des angles des Figures 8_4_B et 8_6_D), et
- 2) une population de cellules qui ont déjà bien commencé leur développement, développement qui provoque l'apparition de formes allongées associées à un nouveau phénotype sous flux caractérisé par un plus faible détachement (9 % comparé à 75 % de détachement pour les NC4a végétatives) et des vitesses de migration importantes avec le flux. Cette motilité ressemble à la « motilité induite par un flux » décrite par Décavé et al. (2003)

Conclusion : Les expériences menées sur les cellules non-axéniques NC4 montrent que l'application d'une contrainte hydrodynamique induit deux types de comportements sous flux selon l'état de développement cellulaire : on observe une résistance au flux pour les cellules dans l'état végétatif (comme pour les AX2M cultivées moins de deux semaines en milieu axénique) et une motilité induite par le flux pour les cellules en phase d'agrégation. Le mode nutritif (phagocytose de bactéries ou pinocytose de milieu fluide axénique) n'est donc pas déterminant dans le choix de l'un ou de l'autre type de comportement cellulaire sous flux.

8.3 Effet du flux hydrodynamique sur la motilité de cellules axéniques AX2-M en conditions de carence nutritive

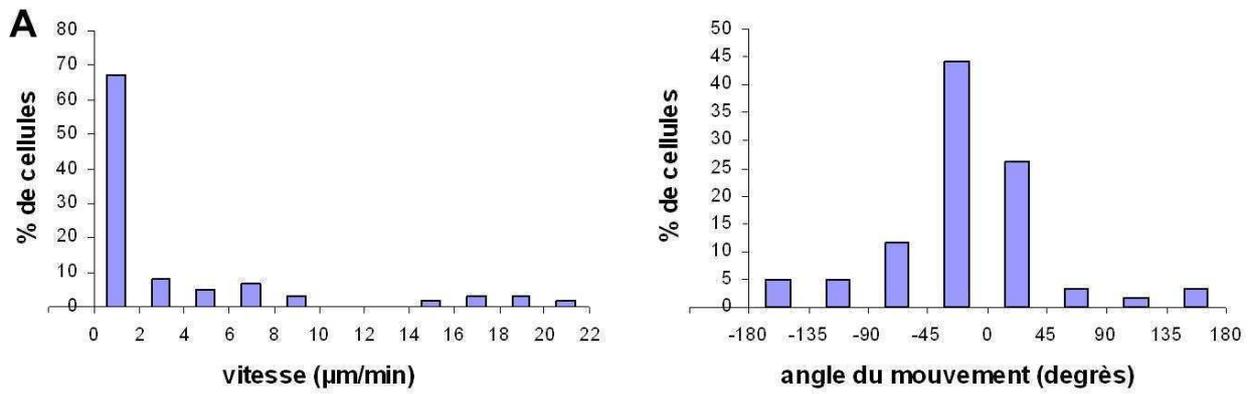
Les résultats précédents obtenus avec des NC4a agrégation-compétentes semblent contradictoires avec ceux de Weber et al. (1995) suggérant une adhérence cellule agrégative-substrat de verre beaucoup plus faible que l'adhérence cellule végétative-substrat.

Néanmoins, il faut souligner que ces auteurs ont utilisé des cellules AX2M qu'ils ont carencées dans du tampon phosphate. On a donc un résultat qui repose sur une autre souche cellulaire et dont l'état de développement est obtenu dans des conditions de carence différentes.

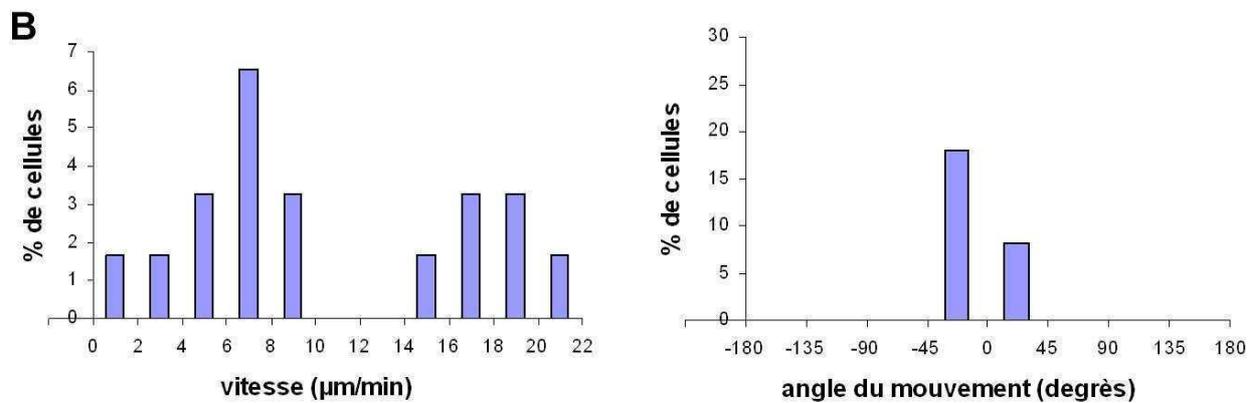
Pour pouvoir comparer mes résultats aux leurs, j'ai donc préparé, à leur manière, des cellules AX2M privées de nourriture en les agitant dans du tampon phosphate (voir protocole de « starvation » dans *Matériels et Méthodes*). Sous une contrainte hydrodynamique de 2,3 Pa, ces cellules se détachent très rapidement (100 % des cellules détachées en une minute) et il est donc impossible d'étudier leur comportement sous flux. Ce résultat correspond bien aux observations de Weber et al. (1995), qui suggèrent fortement que ces cellules agrégatives ont en effet une faible énergie d'adhésion cellule-substrat de verre, bien inférieure à celle de cellules végétatives.

Pourtant, nous venons de voir que des cellules NC4 prises en phase de développement ont des formes allongées typiques des cellules agrégation-compétentes, et pourtant se détachent peu d'un substrat de verre et avancent rapidement sous un flux de 2,3 Pa. La différence provient donc soit de la souche cellulaire (NC4a versus AX2M), soit de la façon de carencer les cellules (dans du tampon phosphate pendant 6-8 heures versus sur un gel de bactéries). En effet, la concentration d'AMPc n'est pas la même pour des cellules dans un milieu semi-solide et pour des cellules en suspension. Pour répondre à cette question, j'ai privé les AX2M de nourriture en les étalant sur un gel recouvert de bactéries et ai prélevé des cellules dans les courants d'agrégation ainsi obtenus derrière le front de cellules végétatives qui se propage par phagocytose de bactéries. Comme pour les NC4a, une majorité de cellules AX2M prélevées dans ces courants présentent des morphologies allongées.

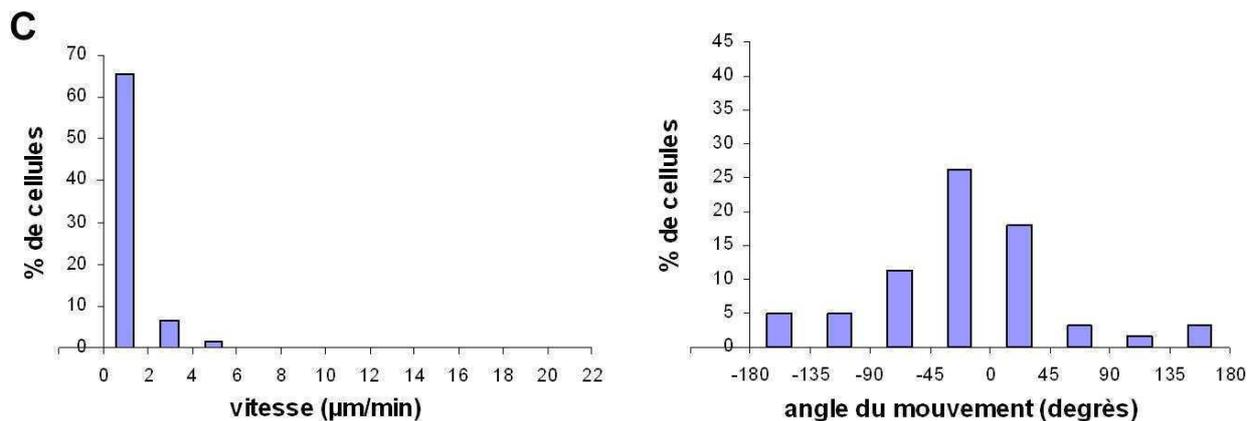
Les résultats obtenus avec ces cellules AX2M sont qualitativement similaires à ceux obtenus avec les NC4a et montrent là encore la présence d'au moins deux populations cellulaires (Fig. 8_7).



A) Distributions des vitesses et des angles pour des cellules AX2M prélevées dans les courants d'agrégation sur un gel initialement recouvert de bactéries, et soumises à un flux de 2,3 Pa pendant 10 minutes.



B) Distributions pour les cellules AX2M qui conservent leur forme allongée sous flux (pourcentages exprimés sur le nombre total de cellules).



C) Distributions des vitesses et des angles pour les cellules AX2M qui montrent une forme arrondie sous flux, quelque soit leur forme initiale.

Figure 8_7: Parmi les AX2M des courants d'agrégation obtenus sur un gel recouvert initialement de bactéries, on peut distinguer deux catégories de cellules qui montrent deux phénotypes distincts de motilité sous flux.

On peut donc là encore supposer que l'on a deux populations de cellules AX2M dans ces cellules prélevées dans les courants d'agrégation sur gel initialement recouvert de bactéries :

- 78 % des cellules se comportent sous flux comme des cellules végétatives avec des morphologies rondes, un détachement similaire à celui des cellules AX2M végétatives (63 % pendant 10 min sous 2,3 Pa) et de faibles vitesses de migration du même ordre de grandeur que celles des cellules végétatives
- 22 % des cellules ont des morphologies allongées stables, se détachent moins que les AX2M végétatives (48 % en 10 min sous 2,3 Pa) et ont de plus grandes vitesses de migration avec le flux (moyenne de $10,5 \pm 6,4 \mu\text{m}/\text{min}$) (Fig. 8_8).

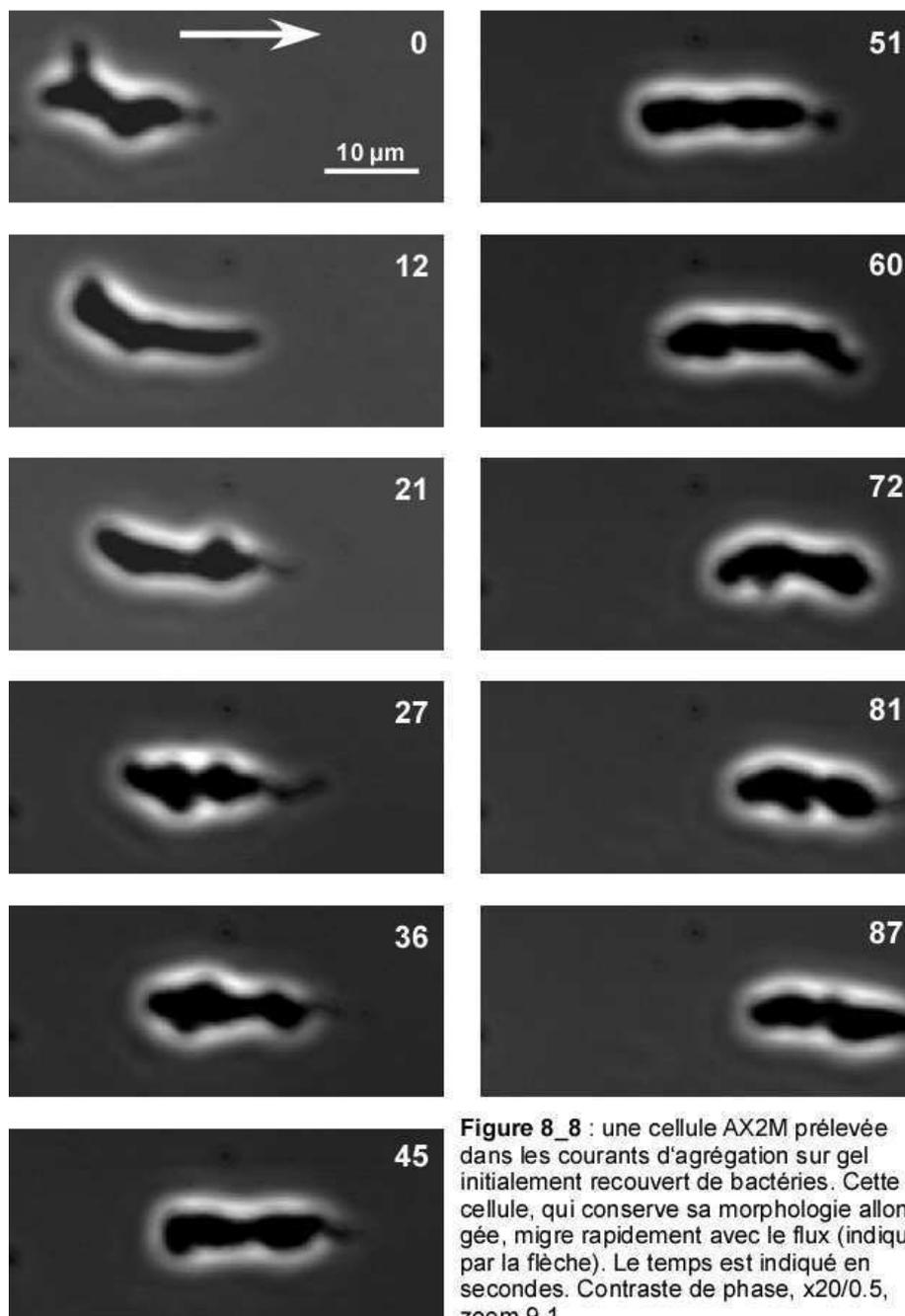


Figure 8_8 : une cellule AX2M prélevée dans les courants d'agrégation sur gel initialement recouvert de bactéries. Cette cellule, qui conserve sa morphologie allongée, migre rapidement avec le flux (indiqué par la flèche). Le temps est indiqué en secondes. Contraste de phase, x20/0.5, zoom 9,1.

Conclusion : La motilité induite par un flux peut donc être observée sur des cellules AX2M fraîches à condition qu'elles soient privées de nourriture sur une surface solide (gel) initialement recouverte de bactéries. Il est possible que dans ces conditions, les cellules soient soumises à de plus fortes concentrations locales d'AMPc, expliquant la différence de comportement observée avec des cellules carencées en tampon phosphate. Cette motilité sous flux de cellules agrégatives est un nouveau type de motilité qui n'est pas associé à une souche cellulaire particulière, mais à la façon de carencer les cellules. Son observation soutient l'idée que des cellules agrégation-compétentes peuvent adhérer relativement fortement à une surface de verre.

Il reste à vérifier si cette motilité est comparable à celle observée avec les cellules AX2G cultivées en culture agitée prolongée.

Conclusion générale :

Le comportement sous flux des cellules *Dictyostelium* et le choix entre « résistance au flux » et « motilité induite par le flux » dépend donc de nombreux paramètres dont :

- la durée de conservation d'une culture cellulaire en milieu nutritif,
- les conditions de culture (flasque agitée versus boîte de Pétri par exemple),
- l'état de différenciation cellulaire
- et la façon de carencer les cellules.

La complexité des phénotypes de réponse à un flux hydrodynamique nous a conduit à porter une plus grande attention à la façon de cultiver et de conserver les cellules. Dans la suite de ce travail, toutes les expériences sous flux ont été réalisées avec des cellules végétatives de cultures conservées entre environ 5 et 15 jours.

IX Résultats, deuxième partie : Réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux et cinétiques de relocalisation de protéines

Dans cette partie, je présente mes résultats concernant la réponse cellulaire à l'application de forces hydrodynamiques et la réorientation cellulaire à la suite du changement de sens du flux. En particulier, je montre que les forces mécaniques du flux polarisent les cellules *Dictyostelium* qui émettent des protrusions riches en actine face au flux. Je quantifie, à la suite du changement de sens du flux, les cinétiques de relocalisation des deux protéines actine et myosine-II, séparément dans des cellules ne possédant qu'un marqueur mais aussi simultanément dans des cellules doublement marquées pour ces deux protéines. Je décris les étapes permettant la réorientation cellulaire sous flux ainsi que la succession temporelle de ces dernières.

9.1 Effet du flux sur les cellules « sauvages » : polarisation et orientation cellulaires

Partant des études indiquant la mécanosensibilité des cellules *Dictyostelium discoideum* (Décavé et al., 2003 ; Fache et al., 2005), le but de mon travail était d'observer en fort grossissement la réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux. J'ai donc mis en place un système simple de tubes rigides et de vannes permettant de changer le sens du flux en environ une seconde.

Pour observer le cytosquelette d'actine, nous avons décidé de marquer l'actine et la myosine-II, qui sont deux protéines principales du cytosquelette (voir *Introduction*), à l'aide de protéines fluorescentes du type GFP. Pour marquer l'actine, la protéine de fusion GFP-actine peut être et a été largement utilisée (Weber et al., 1995 ; Westphal et al., 1997) mais nous lui avons préféré la DdLimE- Δ CC-GFP¹ ou la mRFP-DdLimE- Δ CC² (Fischer et al., 2004) qui permettent de marquer les structures qui contiennent de l'actine qui polymérise (Prassler et al., 1998) et présentent un fond de fluorescence bien moindre que celui de la GFP-actine permettant ainsi d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit. Pour marquer la myosine-II,

¹ Notée Lim-GFP dans la suite

² Notée mRFP-Lim dans la suite

la construction GFP-myosine-II a été utilisée. La GFP du côté N-terminal n'empêche pas la polymérisation en filaments épais et cette protéine de fusion permet ainsi de suivre l'activité de rétraction/contraction au niveau du cortex cellulaire.

Disposant au laboratoire de cellules myosine-II-null HS1 exprimant déjà la construction Lim-GFP, il a été décidé de travailler avec la souche parentale de ces cellules, qui est la souche « sauvage » JH10, gentiment fournie par le laboratoire de Hans Warrick.

Dans un premier temps, afin d'étudier le comportement global de ces cellules sauvages JH10 sous flux, j'ai d'abord effectué des expériences sous un flux de 2,3 Pa avec un « faible » grossissement de 20x de façon à observer un grand nombre de cellules rapidement.

En analysant quantitativement ces films (Fig. 9_1), il apparaît clair que ces cellules migrent plus lentement sous flux (moyenne des vitesses de 0,6 +/- 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$) que sans flux (moyenne des vitesses de 1,3 +/- 1,0 $\mu\text{m}/\text{min}$, $P < 0,01$). Cette observation prouve que le flux affecte la motilité de ces cellules. Sans flux, les cellules migrent aléatoirement dans toutes les directions. Avec flux, l'orientation du mouvement cellulaire est légèrement décalée avec le flux mais 33 % des cellules ont encore tendance à remonter le flux (Fig. 9_1_D).

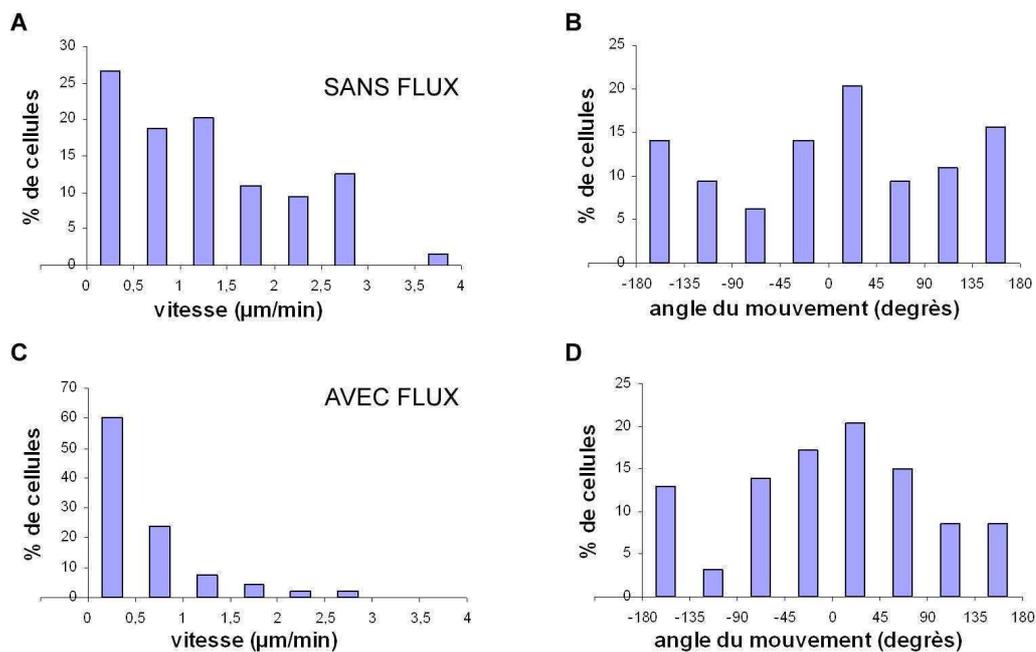


Figure 9_1: Distributions (A) des vitesses et (B) des angles du mouvement de cellules JH10 adhérant à un substrat de verre et non stimulées (64 cellules de deux expériences indépendantes).

Distributions (C) des vitesses et (D) des angles du mouvement de cellules JH10 adhérant à un substrat de verre et soumises à un flux de 2.3 Pa pendant 10 minutes (93 cellules de 4 expériences indépendantes).

Si cette étude en grossissement 20x permet de montrer l'existence d'un effet du flux sur la motilité des cellules sauvages JH10, elle reste néanmoins limitée. La distribution des angles du mouvement et le fait que la migration soit moins rapide ne permettent pas de

conclure quantitativement quant à l'orientation des protrusions cellulaires par rapport au flux. Il est alors nécessaire de visualiser l'activité et la localisation de protéines impliquées dans la migration (en particulier, celles du cytosquelette) afin d'analyser la réponse mécanosensible des cellules à l'application de forces hydrodynamiques.

L'observation en fort grossissement (100x avec zoom 2,5) à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser a alors permis d'observer simultanément la forme des cellules en contraste de phase et la fluorescence des protéines d'intérêt marquées, avec une résolution dans le plan de mise au point de l'ordre de 0,2 μm . Pour ce faire, j'ai construit une nouvelle chambre à flux permettant d'utiliser des lamelles et réduisant la courbure des ces dernières (voir *Matériels et Méthodes*). Dans toute la suite de cette partie II, les expériences ont été réalisées avec la chambre à flux adaptée pour des lamelles sur le microscope confocal LSM410 monté d'un objectif à immersion 100x/1,3.

Dans un premier temps, le marquage des protrusions riches d'actine filamenteuse a permis d'étudier la polarisation cellulaire (c'est-à-dire la présence d'un front avant et d'un front arrière) et l'orientation cellulaire par rapport à la direction du flux. Pour le traitement et l'analyse des films et l'étude de l'orientation cellulaire par rapport au flux, la cellule est divisée en deux moitiés : une moitié face au flux et une moitié en aval du flux, c'est-à-dire non stressée (voir la partie d'analyses d'images de « *Matériels et Méthodes* »).

Pour comprendre quelle était la réponse cellulaire aux forces mécaniques, j'ai observé les cellules sauvages exprimant la Lim-GFP d'abord sans les stimuler puis en les soumettant à l'application d'un flux de 2,1 Pa. A l'inverse, j'ai aussi observé des cellules d'abord soumises au flux et dans un second temps non stimulées. Un exemple typique d'une cellule d'abord non stimulée, puis soumise à un flux de 2,1 Pa, et à nouveau non stimulée est montré dans la Figure 9_2 dans laquelle sont représentées les courbes du ratio de fluorescence de la protéine Lim-GFP (ratio = intensité moyenne d'une moitié cellulaire / fond de fluorescence). Dans la première phase (pas de flux), la cellule migre aléatoirement sur le substrat de verre. Elle alterne alors entre « état polarisé » (présence d'un front avant riche en actine filamenteuse et d'un front arrière rétractant et de forme arrondie) d'orientation non constante et distribuée aléatoirement dans le plan du substrat, et « état non polarisé » (soit sans aucune protrusion, soit avec plusieurs protrusions simultanées, voir photo à $t = 30$ sec de la Figure 9_2_A). Les courbes des ratios pour les deux moitiés cellulaires se croisent mettant en évidence que la cellule change d'orientation. Lorsque le flux est appliqué (ligne verticale à 369 sec), en environ 30 secondes, le ratio de la moitié face au flux devient supérieur (compris entre 3 et 5)

au ratio de la moitié non stimulée (compris entre 1 et 2). La cellule est donc polarisée et elle est orientée face au flux (voir photo à $t = 603$ sec de la Figure 9_2_A). Cet état de polarisation et cette orientation sont maintenus pendant toute la durée d'application du flux.

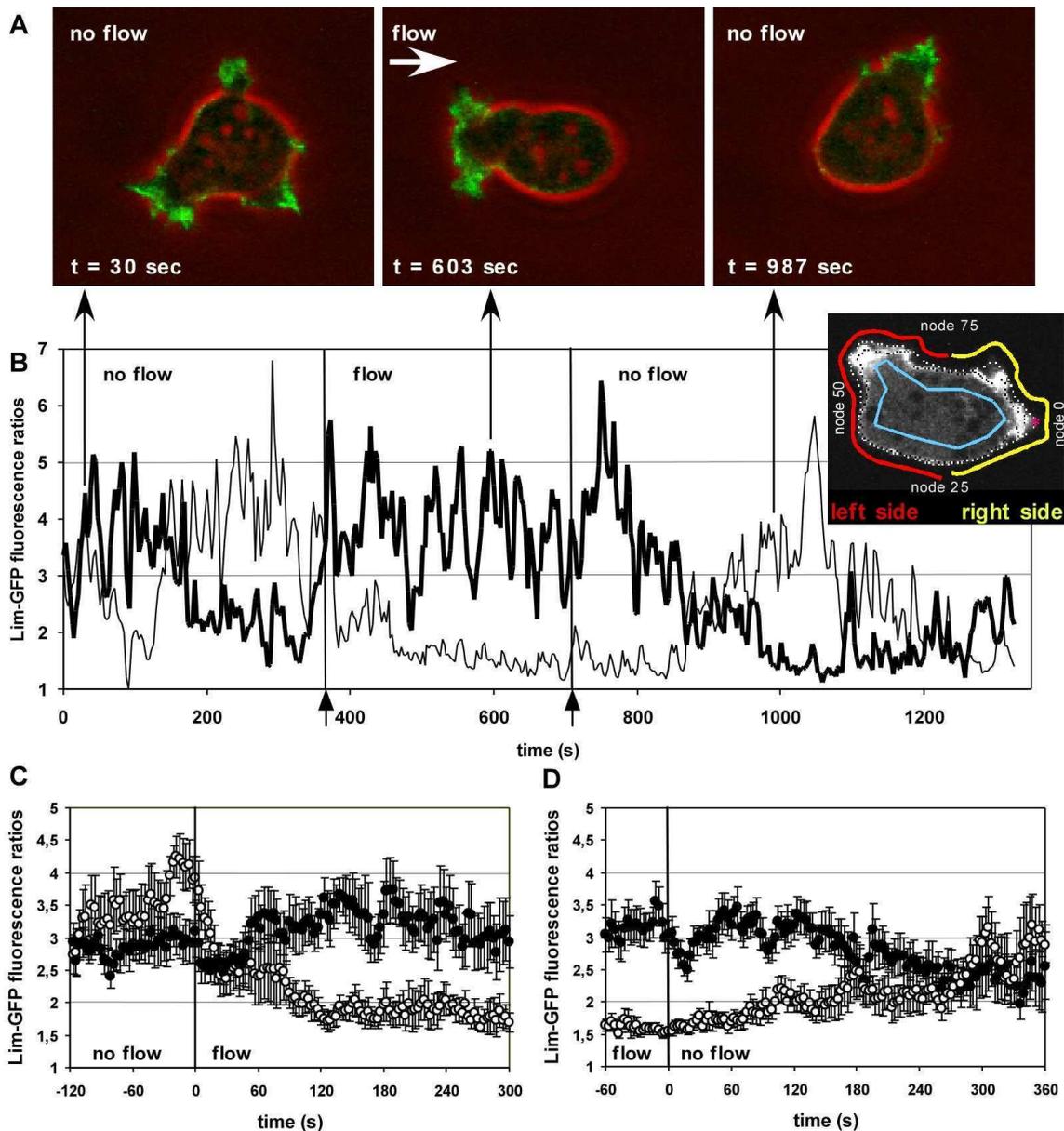


Figure 9_2: Polarisation cellulaire sous un flux de cisaillement hydrodynamique

Des cellules *Dictyostelium* JH10 exprimant la Lim-GFP sont enregistrées alternativement soumises et non soumises à une contrainte hydrodynamique constante de 2.1 Pa. Les ratios de fluorescence sont quantifiés le long du contour cellulaire et moyennés sur les côtés cellulaires droit et gauche (voir *Matériels et Méthodes*).

A & B. Expérience sur cellule unique. Des photos avant ($t = 30$ sec), pendant ($t = 603$ sec) et après ($t = 987$ sec) l'application du flux sont montrées. La contrainte est appliquée entre 375 et 705 sec (lignes verticales avec flèches dans le panel B), la direction du flux est indiquée par la flèche dans le panel A. Les lignes épaisses et fines correspondent aux côtés cellulaires gauche et droit respectivement. **C. Cinétiques de polarisation avec la Lim-GFP.** Les ratios moyens de fluorescence correspondant aux côtés amont et aval sont représentés en fonction du temps relativement au début d'application du flux (8 cellules observées pendant 11 expériences de polarisation). Les cercles pleins et creux correspondent aux côtés cellulaires amont et aval, respectivement. **D. Cinétiques de dépolarisation avec la Lim-GFP.** Les ratios moyens de fluorescence sont représentés en fonction du temps relativement à la fin d'application du flux (13 expériences de dépolarisation effectuées avec 9 cellules). Les cercles pleins et creux correspondent aux côtés cellulaires amont et aval, respectivement. La barre d'erreur est de la taille de l'erreur standard sur la moyenne.

Dans la troisième phase (ligne verticale à 699 sec), le flux est stoppé. La cellule garde sa polarisation contre le flux pendant environ 120 secondes, puis adopte à nouveau une migration aléatoire et protrude dans différentes directions (voir photo à $t = 987$ sec de la Figure 9_2_A).

J'ai observé 17 cellules lors du passage d'une situation sans flux à l'application d'un flux de 2,1 Pa. Sur 24 tests réalisés avec ces cellules, à 14 occasions les cellules se sont réorientées contre le flux ; à 5 reprises, les cellules n'ont pas montré de polarité ; à une reprise, la cellule était polarisée mais pas contre le flux ; et enfin, 4 fois, les cellules se sont détachées du substrat suite à l'application du flux.

En moyennant les courbes obtenues lors du passage des conditions « pas de flux » à « application d'un flux de 2,1 Pa » et « application d'un flux de 2,1 Pa » à « pas de flux », on obtient les courbes C) et D) de la Figure 9_2.

Etant donné que les cellules migrent aléatoirement sans flux, les deux moyennes sur une dizaine de cellules des deux ratios pour les deux moitiés cellulaires sont égales et fluctuent légèrement autour d'une valeur moyenne de 3. Lorsque le flux est appliqué, ces deux courbes se séparent en environ une minute et le ratio de fluorescence de la Lim-GFP du front face au flux se stabilise autour de 3,3 alors que celui de la moitié en aval se stabilise autour de 1,7. Ceci montre que le flux polarise et oriente les cellules en environ une minute. Au contraire, lorsque des cellules sont polarisées face au flux et que l'on stoppe le flux, les moyennes des deux ratios se rejoignent pour s'égaliser après environ 4 minutes. Cela montre que les cellules conservent leur orientation contre le flux pendant plus de trois minutes même après l'arrêt du flux. Nous nous sommes alors intéressés, par comparaison, à la persistance temporelle de l'orientation cellulaire dans une direction stable dans le cas de cellules migrant sans contrainte. Cette analyse a permis de montrer que, pour les cellules JH10, l'orientation cellulaire est maintenue stable dans une direction avec un front riche en actine filamenteuse sur une durée moyenne de 88 ± 44 secondes ($n = 33$ avec 11 cellules), soit environ une minute et demie, ce qui est inférieur au temps d'orientation cellulaire stable après l'arrêt du flux (voir un exemple d'analyse sous forme de polar plot de l'orientation d'une telle cellule non stimulée dans la Figure 9_3).

Une autre question est de savoir si une cellule polarisée contre un flux constant de 2,1 Pa peut rester indéfiniment polarisée et orientée de cette manière. Pour y répondre, j'ai observé 30 cellules sous un flux constant pendant au moins 4 minutes. Dans 32 cas sur 48 tests (63 %), les cellules sauvages ont maintenu leur orientation stable contre le flux pendant

ces 4 minutes, et certaines d'entre elles pendant plus de 8 minutes. Il est donc arrivé d'observer des cellules qui ne pouvaient pas maintenir leur orientation contre le flux. Dans ce cas, elles adoptaient une orientation latérale (perpendiculaire à la direction du flux) ou avec le flux comme cela a déjà été observé avec des cellules soumises à des forces de centrifugation (Fukui et al., 2000). Différentes raisons peuvent expliquer ce comportement : le front avant contre le flux était mécaniquement poussé par les forces hydrodynamiques et était ainsi entraîné sur les côtés ou au-dessus de la cellule (Fig. 9_4 ; Fukui et al., 2000), à la suite de quoi les cellules pouvaient dériver avec le flux. Il est aussi arrivé que des cellules perdent temporairement leur polarisation (rétraction de l'unique pseudopode existant, morphologie ronde). Dans ces cas, et à condition que les cellules ne se soient pas détachées du substrat, la plupart retrouvaient un état polarisé et se réorientaient contre le flux quelques dizaines de secondes plus tard.

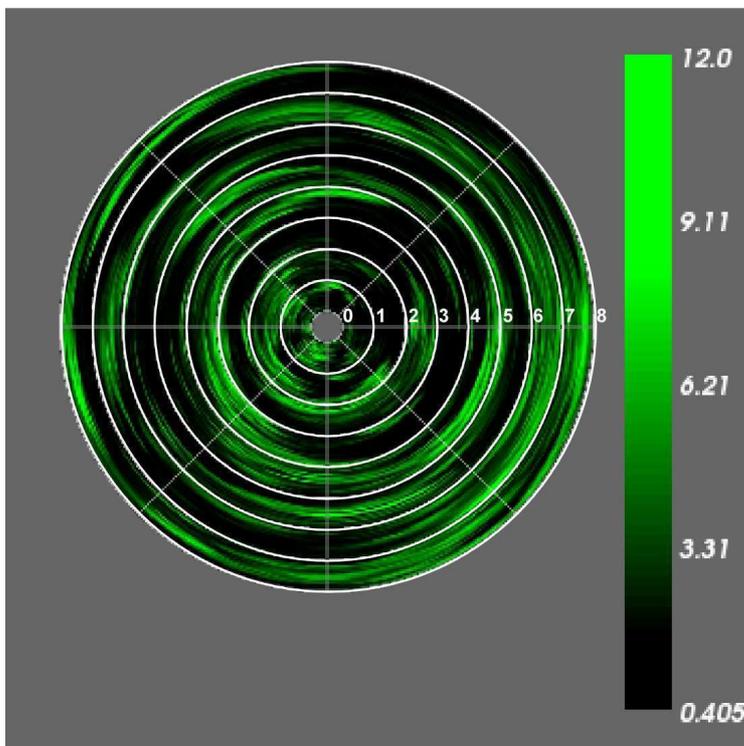


Figure 9_3: Analyse sous forme de polar plot de la polarité et de l'orientation d'une cellule JH10 + Lim-GFP non stimulée. La cellule change son orientation à plusieurs reprises et de manière aléatoire dans toutes les directions du plan du substrat. Le temps est indiqué en minutes. L'échelle de couleurs indique la valeur des ratios de fluorescence tout autour de la cellule.

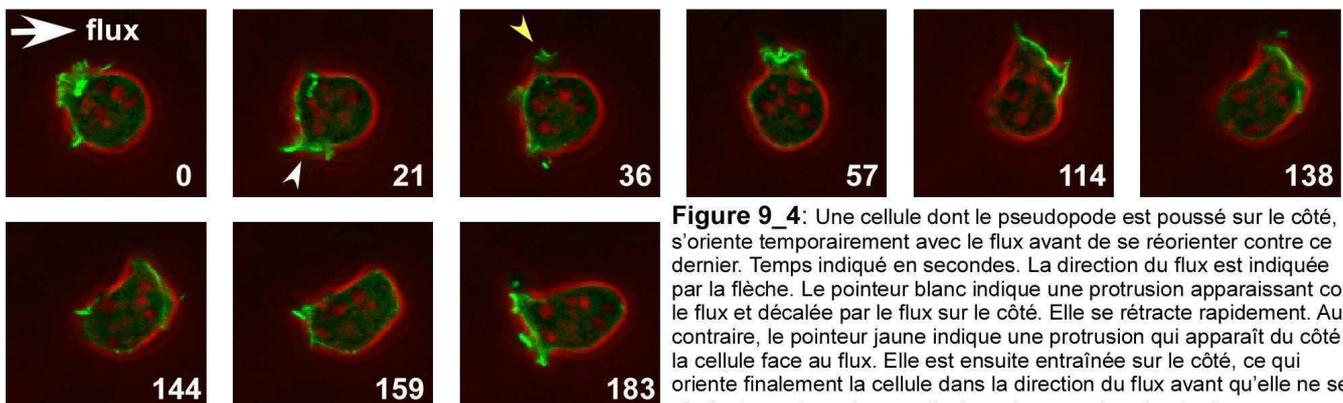


Figure 9_4: Une cellule dont le pseudopode est poussé sur le côté, s'oriente temporairement avec le flux avant de se réorienter contre ce dernier. Temps indiqué en secondes. La direction du flux est indiquée par la flèche. Le pointeur blanc indique une protrusion apparaissant contre le flux et décalée par le flux sur le côté. Elle se rétracte rapidement. Au contraire, le pointeur jaune indique une protrusion qui apparaît du côté de la cellule face au flux. Elle est ensuite entraînée sur le côté, ce qui oriente finalement la cellule dans la direction du flux avant qu'elle ne se réoriente contre quelques dizaines de secondes plus tard.

En conclusion, un flux de 2,1 Pa polarise des cellules sauvages de la souche JH10 de *Dictyostelium discoideum* et l'activité de polymérisation de l'actine est orientée exclusivement contre le flux. Cette polarisation contre le flux, qui est stable et persiste plusieurs minutes, apparaît environ une minute suivant l'application du flux, et lorsque le flux est stoppé, les cellules conservent cette orientation pendant plus de trois minutes.

9.2 Réorganisation du cytosquelette d'actine après un changement de sens du flux

Pour observer la réorganisation du cytosquelette d'actine, un moyen facile était de changer rapidement la direction du flux. J'ai donc mis en place un système permettant de changer en environ une seconde cette direction au moyen de vannes (voir Figure 7_6). Ce système, associé à la chambre à flux pour lamelles, a ainsi permis d'enregistrer la réponse d'une cellule préalablement polarisée et orientée contre le flux juste après un changement de sens de l'écoulement du liquide. Sur 74 tests d'inversion d'un flux de 2,1 Pa effectués avec 53 cellules, 51 tests ont montré une réorientation contre le flux avec relocalisation de la Lim-GFP au nouveau front exposé, confirmant le phénomène de polymérisation de l'actine du côté mécaniquement stimulé. Au contraire, dans 23 tests, les cellules ne se sont pas réorientées contre le nouveau flux (parmi celles-ci 12 ont perdu leur polarité après l'inversion du flux, et 11 cellules ont décollé dans les deux minutes suivant le changement de sens). Parmi les 51 réussites de réorientation contre le nouveau flux, une majorité de cellules (33) ont d'abord vu l'ancien front avant perdre sa fluorescence et dans un deuxième temps, le nouveau front stimulé recruter la Lim-GFP. Huit changements de sens du flux ont montré un état bipolaire ou avec plusieurs (plus de deux) fronts dans différentes directions avant que la cellule ne s'oriente finalement et uniquement contre le nouveau flux. Trois cellules ont d'abord conservé leur orientation initiale et ont commencé un U-turn sans pouvoir le finir et se sont finalement réorientées contre le nouveau flux en inversant leur polarité. Enfin, 7 tests ont montré des cellules orientées de manière instable avec une alternance rapide entre un état avec et un état contre le flux.

Sur la totalité des expériences, une grande majorité de cellules se sont donc réorientées contre le flux (69 %) et lors de ces réorientations contre le nouveau flux, il apparaît clairement que, dans la majorité des cas, les cellules inversent directement leur polarité : l'ancien front arrière devient le nouveau front avant et inversement. Pour tracer les cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP, j'ai exclu les cellules qui ont manqué d'adhésion (et qui

alternent souvent entre état avec et état contre le flux) et celles dont la réorientation a été retardée par exemple du fait de la tentative de faire un U-turn ou du fait de la courbure mécanique provoquée par le flux du front avant sur les côtés ou au-dessus de la cellule, ou de la perte temporaire de la polarité. J'ai aussi exclu les cellules qui ont montré deux ou plusieurs fronts simultanés.

Dans le panel A de la Figure 9_5, on peut voir une séquence de photographies d'une cellule typique considérée pour quantifier la relocalisation de la Lim-GFP après un changement de sens du flux. A $t = -9$ sec, la cellule protrude contre le flux avec un front avant marqué par la Lim-GFP. Rapidement après le changement de sens du flux, la Lim-GFP commence à se dissocier de ce front (photo à 18 sec) pour finalement laisser ce front quasi dépourvu de Lim-GFP (photo à 30 sec). Finalement, des petites protrusions riches en Lim-GFP apparaissent du côté face au flux (voir photo à 54 sec) et environ une minute et demie après le changement de sens, la cellule émet un large pseudopode contre le flux (photo à 141 sec). La quantification de la relocalisation de Lim-GFP dans cette cellule a donné les courbes des ratios de fluorescence de chaque moitié cellulaire du panel B de la Figure 9_5. En moyennant sur l'ensemble des cellules sauvages sous un flux de 2,1 Pa, on obtient les courbes de relocalisation pour la Lim-GFP de la Figure 9_6 (moyenne sur 18 réorientations avec 14 cellules).

Les courbes moyennes des ratios de fluorescence de la Lim-GFP pour les deux moitiés cellulaires montrent que les cellules sont initialement orientées contre le flux (ratio moyen de 3,4 de la moitié face au flux et de 1,3 du côté non stimulé). A $t = 0$ sec (ligne verticale), la direction du flux est inversée et après un délai d'environ 6 sec, le ratio du côté nouvellement en aval commence à décroître exponentiellement avec un temps caractéristique de 24 sec. Après environ 80 sec, le ratio de ce côté se stabilise autour d'une valeur moyenne de 1,3. Du côté cellulaire nouvellement exposé au flux, on observe un délai de 30 sec avant que le ratio de fluorescence n'augmente à partir de la valeur 1,3. Le temps caractéristique de cette croissance est de 45 sec et permet d'atteindre, environ 120 sec après le changement de sens du flux, un plateau avec un ratio de 3,4. La cellule est alors à nouveau orientée contre le flux. Ce modèle de réorientation à 180° correspond donc à une inversion des côtés avant et arrière de la cellule. Il est important de noter qu'entre 15 et 50 sec suivant le changement de sens du flux, la polymérisation de l'actine est à un minimum qui correspond à l'inversion de la polarité cellulaire. Cette dépolymérisation de l'actine n'a pas été observée quand le flux était simplement arrêté (voir Figure 9_2_D). Enfin, ces courbes de relocalisation de la Lim-GFP

dans les cellules sauvages sont asymétriques, avec une décroissance très rapide du ratio de fluorescence et une croissance plus lente.

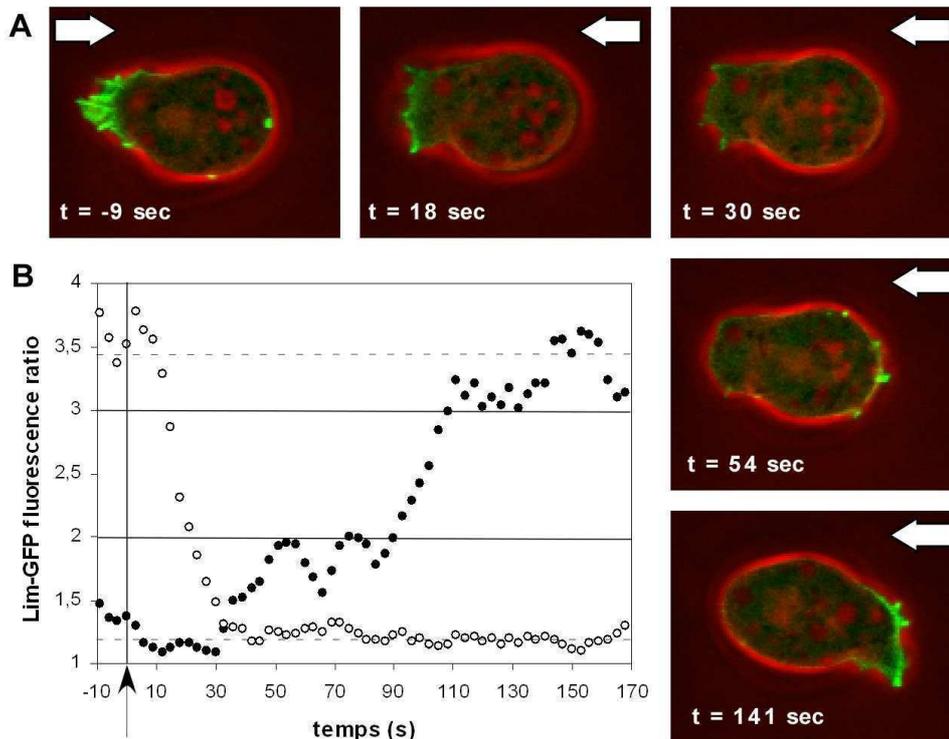


Figure 9_5: Une cellule JH10 exprimant la Lim-GFP sous un flux de 2,1 Pa dont la direction est inversée à $t = 0$.
A) Le temps est indiqué en secondes. En vert : fluorescence de Lim-GFP. En rouge : contraste de phase. Les flèches indiquent la direction du flux.
B) Cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP dans cette cellule unique. Les cercles creux et pleins correspondent aux côtés cellulaires aval et amont, après le changement de sens du flux, respectivement.

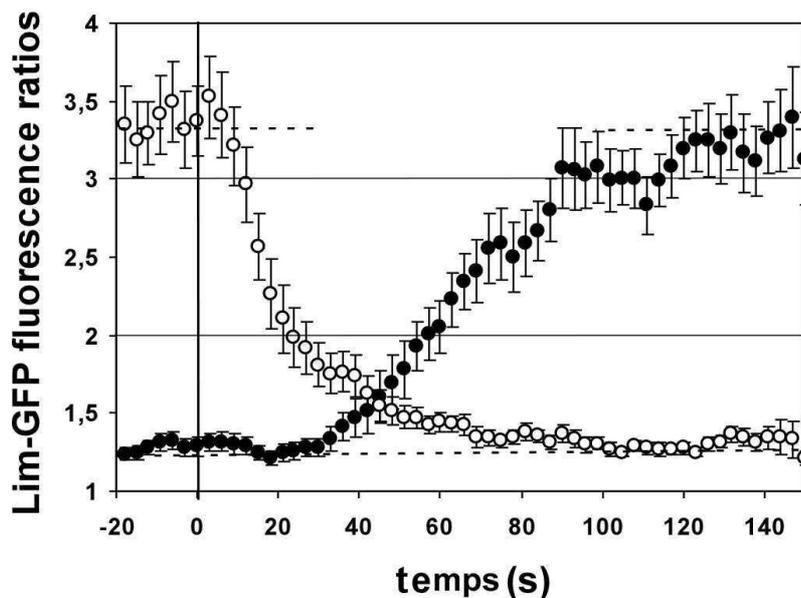


Figure 9_6: Cinétiques moyennes de relocalisation de la Lim-GFP dans les cellules JH10 sous un flux de 2,1 Pa (moyenne sur 18 réorientations avec 14 cellules). La direction du flux est inversée à $t = 0$. Pour chaque cellule individuelle, le ratio de fluorescence est quantifié le long de tout le contour cellulaire et moyenné séparément sur les moitiés gauche et droite de la cellule. Les barres d'erreur sont de la taille de l'erreur standard sur la moyenne. Les cercles creux et pleins correspondent aux côtés cellulaires aval et amont, après le changement de sens du flux, respectivement. Les lignes pointillées indiquent les plateaux pour les ratios de fluorescence de chaque côté.

Pour étudier l'influence du taux de cisaillement (c'est-à-dire l'influence des forces exercées sur chaque cellule) sur le processus de réorientation, les mêmes expériences de changement de sens du flux ont été réalisées sous un flux de 0,9 Pa. La courbe moyenne de relocalisation pour la Lim-GFP dans les cellules sauvages est présentée dans la Figure 9_7_A. Il apparaît que la Lim-GFP disparaît de l'ancien front face au flux à la même vitesse sous 0,9 Pa que sous 2,1 Pa (même cinétique de dissociation). Par contre, elle se relocalise plus rapidement du côté nouvellement stimulé : la croissance débute plus tôt (18 sec après le changement de sens du flux au lieu de 30 sec à 2,1 Pa) et est légèrement plus rapide. Le plateau supérieur est donc atteint environ une minute après le changement de sens du flux. Cette étude met donc en évidence un effet du taux de cisaillement sur la cinétique de réorganisation du cytosquelette.

La représentation à l'aide de graphes polaires (polar plots ; Fig. 9_7_B) permet une visualisation rapide et simple du processus de réorientation. Avant le changement de sens du flux (à $t = 0$), la cellule est orientée avec son front protrusif dirigé contre le flux, c'est-à-dire vers la droite. Lorsque la direction du flux est inversée (la nouvelle direction est de la gauche vers la droite), la cellule passe par une phase sans polymérisation d'actine (ceci est observé pour les deux flux de 0.9 et 2.1 Pa et se visualise sur les deux graphes polaires autour de 25-30 sec par une région sombre (bleue) tout autour de la cellule). Puis, une nouvelle accumulation d'actine filamenteuse apparaît du côté gauche.

9.3 Relocalisation de la GFP-myo-II après un changement de sens du flux

Jusqu'à présent, nous avons observé le front avant d'une cellule, où a lieu la projection de protrusions grâce essentiellement à la polymérisation de l'actine (Mitchison and Cramer, 1996 ; Carlier, 1998 ; Carlier et al., 2003). La myosine-II, elle, s'accumule à l'arrière de la cellule (Moores et al., 1996) où elle aide à la production de forces de contraction (Yumura et al., 1984; Jay et al., 1995) permettant la rétraction de ce bord cellulaire. Nous avons donc cherché à visualiser les mouvements de rétraction de l'arrière et la localisation de la myosine-II en la marquant à l'aide de la GFP. Deux souches cellulaires ont été transformées à l'aide d'un vecteur codant pour la GFP-myo-II (du côté N-terminal ; Moores et al., 1996) : les JH10 (cellules sauvages) et les HS1 (cellules myo-II-null dérivées des JH10 ; Ruppel et al., 1994).

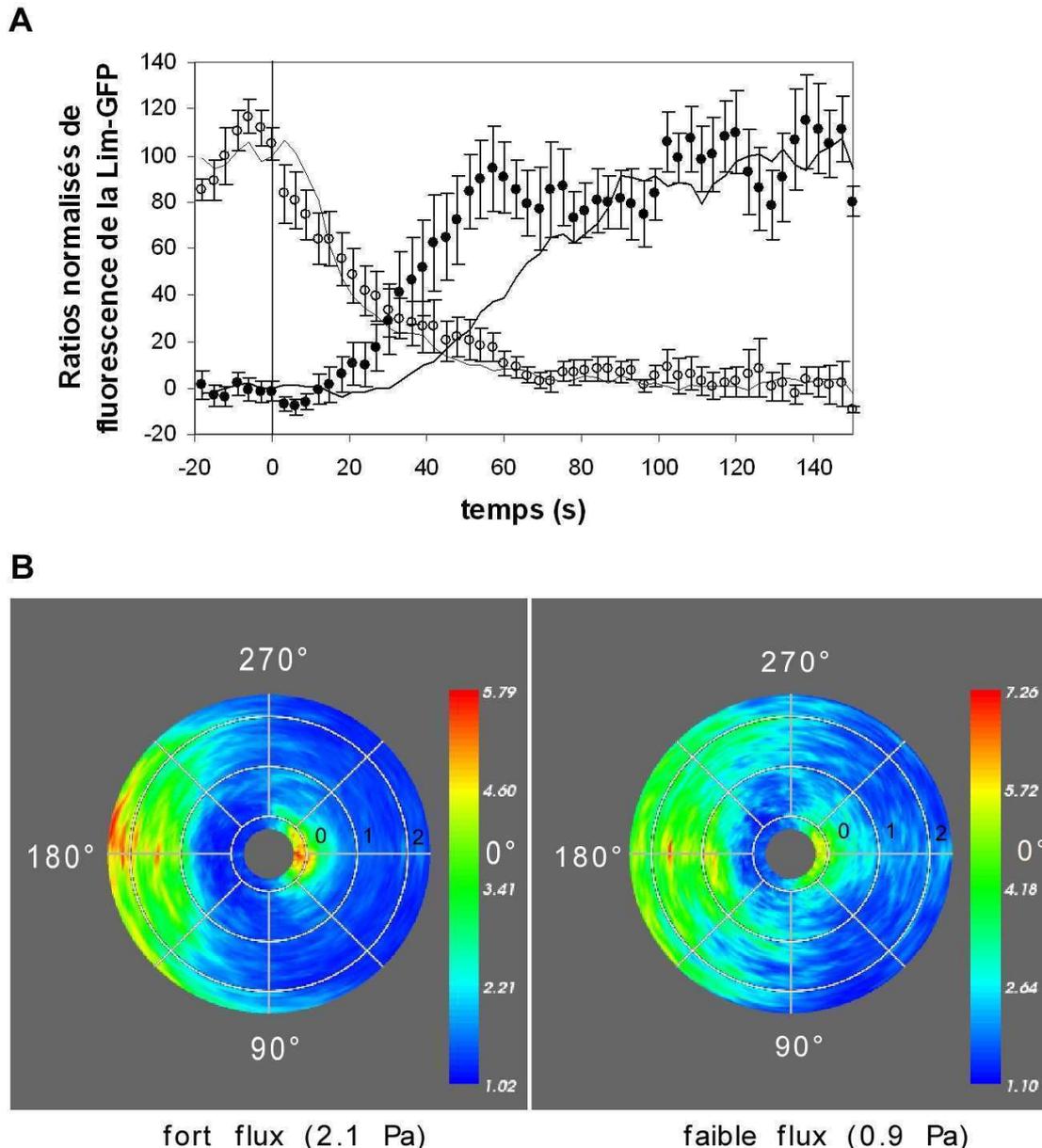


Figure 9_7: **A)** Cinétiques moyennes de relocalisation de la Lim-GFP dans les cellules JH10 sous un flux de 0,9 Pa (moyennes de 10 relocalisations obtenues avec 5 cellules ; cercles creux et pleins utilisés comme pour la Figure 9_6). Les courbes sont normalisées (voir *Matériels et Méthodes*) de manière à pouvoir les comparer facilement aux courbes sous 2,1 Pa (lignes pleines, données de la Figure 9_6). Les barres d'erreur sont de la taille de l'erreur standard sur la moyenne.

B) Graphes polaires pour le ratio de fluorescence de la Lim-GFP sous 2,1 et 0,9 Pa. Les deux graphes sont les graphes moyens, respectivement, de 18 réorientations avec 14 cellules sous 2,1 Pa et de 10 expériences d'inversion du flux réalisées avec 5 cellules sous 0,9 Pa. Le premier anneau blanc au centre coïncide avec l'inversion de la direction du flux. Le temps est indiqué en minutes. Les échelles de couleurs indiquent les valeurs du ratio de fluorescence.

Dans la Figure 9_8, le panel A montre une cellule typique marquée à la GFP-myo-II. Initialement le flux est dirigé vers la gauche (photo à $t = -9$ sec), la cellule protude contre le flux et du côté aval, apparaît clairement un croissant de GFP-myo-II qui est associé à un mouvement de rétraction. Après le changement de sens du flux (ligne verticale à $t=0$ sur les courbes), la fluorescence de l'ancien côté arrière décroît lentement (photo à $t = 21$ sec) et

simultanément, la GFP-myo-II commence à s'accumuler du côté nouvellement aval. La cellule arrête alors de protruder de ce côté. La GFP-myo-II est ainsi distribuée un peu tout autour de la cellule (photo à 36 sec). Finalement, la cellule commence à émettre des protrusions contre le flux environ 50 secondes après le changement de sens du flux (photo à 54 sec). En même temps que ces protrusions contre le flux grandissent, la GFP-myo-II quitte le front avant contre le flux et s'accumule du côté non stimulé. Le mouvement de rétraction de ce bord commence environ une minute après le changement de sens du flux. La photo à 87 secondes montre à nouveau un croissant de GFP-myo-II au nouveau côté arrière de la cellule. La cellule a donc accompli une complète réorientation contre le flux en inversant front avant et front arrière après le changement de sens du flux.

La courbe de la Figure 9_8 (panel B) montre les variations, sous un flux de 2,1 Pa, des ratios de fluorescence de la GFP-myo-II dans les cellules sauvages et dans les cellules myo-II-null (et donc complétées par la GFP-myo-II). Cette courbe est la moyenne sur l'ensemble des deux types cellulaires, ce qui permet d'augmenter le nombre de courbes prises en compte pour tracer la courbe moyenne totale, les deux courbes moyennes obtenues avec chacun des deux types cellulaires étant similaires. Avant le changement de sens du flux, le côté de la cellule en aval du flux montre un ratio de fluorescence moyen autour de 1,7 et le front face au flux autour de 1,2. La cellule est polarisée contre le flux et accumule de la GFP-myo-II à l'arrière qui rétracte en remontant le flux. Après le changement de sens du flux (ligne verticale sur la courbe), le ratio de fluorescence du côté nouvellement face au flux décroît lentement après un délai de quelques secondes et atteint son plateau inférieur avec une moyenne de 1,18 en environ 90 secondes. Du côté situé en aval du nouveau flux, le ratio augmente de 1,2 à 1,7 en environ 90 secondes. Il est à noter que ces deux courbes de dissociation du côté face au flux et d'association au côté non stimulé sont symétriques, contrairement aux cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP. De plus, la décroissance du ratio de fluorescence de la GFP-myo-II (temps caractéristique de 72 sec) est bien plus lente que celle de la Lim-GFP (temps caractéristique de 24 sec).

Sur le graphe polaire de la redistribution de la GFP-myo-II (Fig. 9_8_C), il apparaît clairement que la GFP-myo-II est distribuée tout autour de la cellule sur la période de temps située entre environ 30 et 60 secondes suivant le changement de sens du flux.

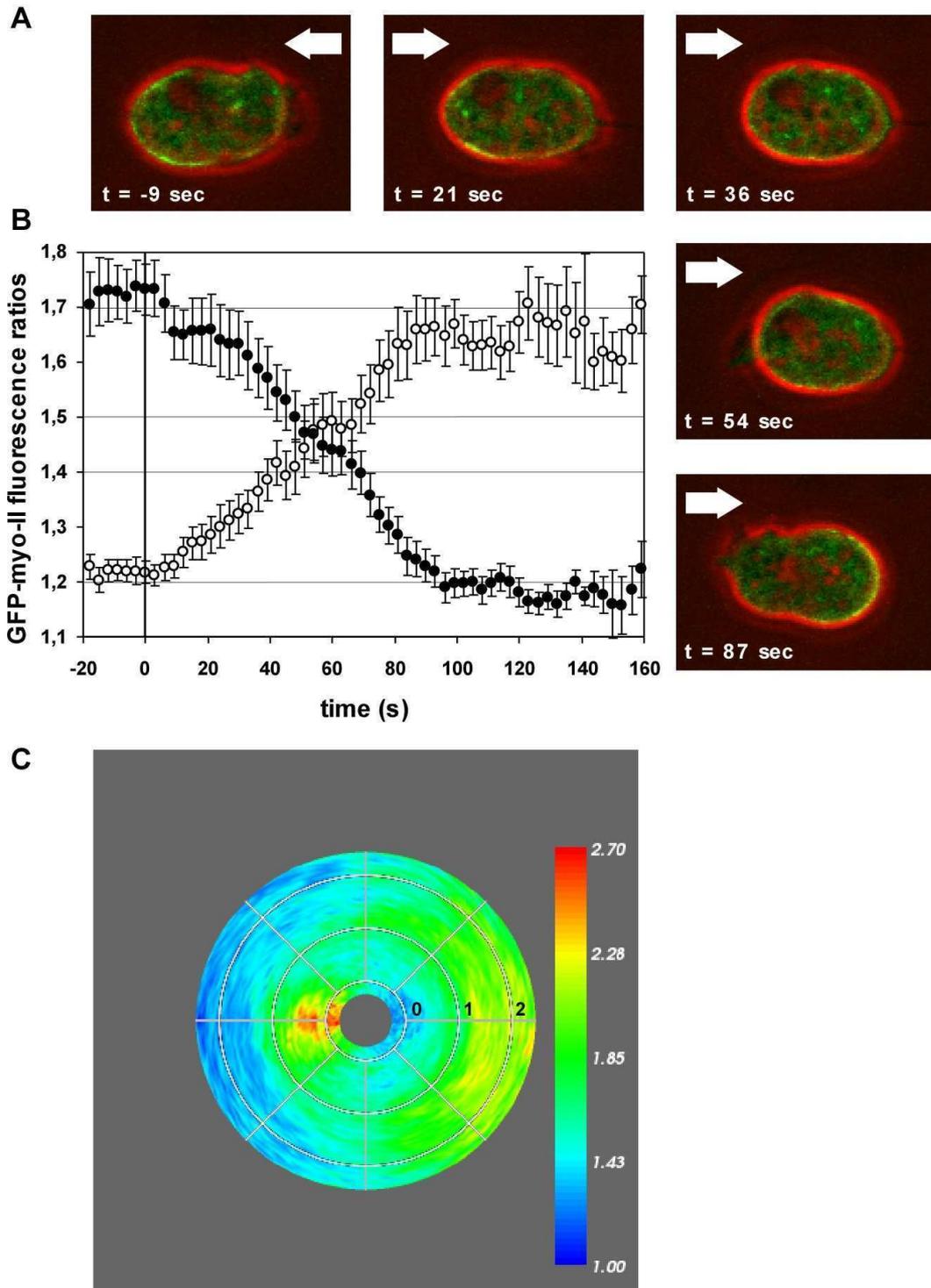


Figure 9_8: Relocalisation de la GFP-Myo-II après le changement de sens d'un flux de 2,1 Pa.

Les cellules JH10 et HS1 exprimant la GFP-myo-II sont soumises à une contrainte de cisaillement de 2,1 Pa, et la direction du flux est rapidement changée.

A) Une galerie d'images montrant la distribution de la GFP-myo-II dans une cellule unique JH10 avant et après l'inversion du flux (la direction du flux est indiquée par les flèches). Le temps est exprimé en sec relativement au moment d'inversion du flux. En vert : fluorescence de la GFP-myo-II. En rouge : contraste de phase.

B) Cinétiques moyennes de relocalisation de la GFP-Myo-II (20 expériences réalisées avec 14 cellules). Les courbes moyennes des ratios de fluorescence de la GFP-myo-II des côtés amont et aval sont dessinées en fonction du temps relativement à l'inversion du flux. Les cercles creux et pleins correspondent aux côtés cellulaires aval et amont, après le changement de sens du flux, respectivement. Les barres d'erreur sont de la taille de l'erreur standard sur la moyenne.

C) Graphe polaire pour le ratio de fluorescence de la GFP-myo-II sous 2,1 Pa. Le graphe est la moyenne de 20 expériences d'inversion du flux, réalisées avec 14 cellules. Le premier anneau blanc au centre coïncide avec l'inversion de la direction du flux. Le temps est indiqué en minutes.

9.4 Durant la réorientation sous un flux de 2,1 Pa, l'activité protrusive dépendant de l'actine précède la rétraction dépendant de la GFP-myo-II

Une question qui nous a semblé intéressante était de savoir si, pendant le processus de réorientation après un changement de sens du flux, la rétraction de l'arrière et l'émission de protrusions étaient simultanées ou successives, et dans ce dernier cas, dans quel ordre.

Il est clair que l'accumulation de Lim-GFP coïncide avec l'apparition de protrusions au front avant. Par contre, il n'est pas évident que l'arrière rétracte dès que la GFP-myo-II commence à s'accumuler de ce côté. De manière à pouvoir suivre simultanément dans la même cellule, l'activité protrusive du front avant et la rétraction de l'arrière dépendant de la myo-II, nous avons donc marqué des cellules avec deux protéines fluorescentes.

Les cellules HS1 ont donc été transformées deux fois de manière à exprimer la mRFPmars-LimE- Δ CC³ (Fischer et al., 2004) et la GFP-myo-II. Les mêmes expériences de changement de sens d'un flux de 2,1 Pa ont été réalisées et la relocalisation de chaque marqueur quantitativement analysée comme précédemment.

Un exemple typique d'une cellule avec ces deux marqueurs est montrée dans la Figure 9_9 (A). Sous un flux de 2,1 Pa, cette cellule est clairement polarisée avec un front avant riche en mRFP-Lim qui protreude contre le flux et un bord arrière en forme de croissant où s'accumule de la GFP-myo-II (photo à - 12 sec). Lorsque la direction du flux est changée, la fluorescence de mRFP-Lim décroît rapidement (photo à 21 sec). Environ 24 secondes suivant le changement de sens, la GFP-myo-II commence à s'accumuler du côté nouvellement en aval (photo à 36 sec). Après environ 40 secondes, une protrusion contre le flux apparaît et devient la seule protrusion stable (photo à 48 sec). Il arrive toutefois de remarquer la présence d'autres protrusions plus petites sur les côtés de la cellule (marquées par des pointeurs blancs sur la photo à 48 sec). Ces protrusions apparaissent et disparaissent rapidement et seul le pseudopode contre le flux est maintenu. La rétraction du nouveau bord arrière commence après environ une minute (voir photo à 72 sec) alors que la GFP-myo-II est encore distribuée tout autour du cortex. Avec le temps, la GFP-myo-II se relocalise de plus en plus du côté aval et après environ deux minutes, la cellule montre une accumulation brillante de GFP-myo-II à l'arrière en forme de croissant, ainsi qu'un front avant riche en actine filamenteuse et protrudant contre le flux (photo à 108 sec).

³ notée mRFP-Lim dans la suite

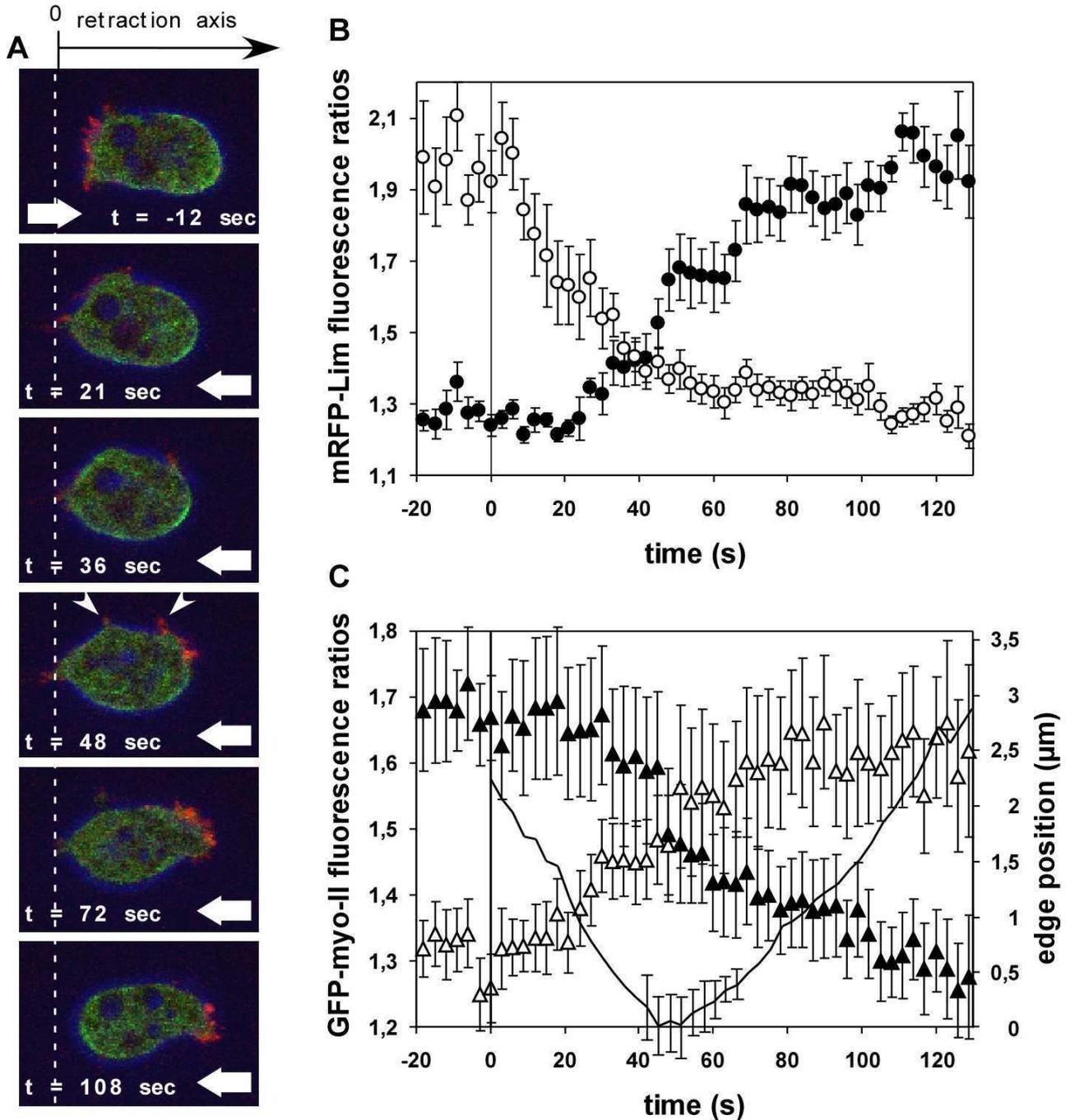


Figure 9_9: Relocalisation de la mRFP-Lim et de la GFP-myosin-II après un changement de sens du flux. Les cellules HS1 doublement marquées avec la mRFP-Lim et la GFP-myosin-II sont soumises à une contrainte hydrodynamique de 2,1 Pa, dont la direction est inversée.

A) Galerie de photos montrant la distribution de la mRFP-Lim et de la GFP-myosin-II dans une cellule unique avant et après un changement de sens du flux. Le temps est exprimé relativement à l'inversion du flux. Fluorescence de la GFP-myosin-II (vert) et de la mRFP-Lim (rouge). En bleu : contraste de phase. La ligne pointillée blanche indique la position la plus à gauche du bord cellulaire aval après le changement de sens. Les flèches indiquent la direction du flux.

B et C) Cinétiques de relocalisation de la mRFP-Lim et de la GFP-myosin-II et position du bord arrière. Les courbes moyennes des ratios de fluorescence des côtés aval et amont de la mRFP-Lim (panel B) et de la GFP-myosin-II (panel C) sont dessinées en fonction du temps relativement à l'inversion du flux (16 inversions réalisées avec 11 cellules). Pour les deux graphes, les symboles creux (respectivement pleins) correspondent au côté aval (respectivement amont) après le changement de sens du flux. Le panel C montre aussi la position moyenne du bord cellulaire arrière sur l'axe de rétraction en fonction du temps (ligne épaisse) (un exemple d'un tel axe est représenté dans le panel A ; moyenne sur 16 réorientations avec 11 cellules). Les barres d'erreur sont de la taille de l'erreur standard sur la moyenne.

Les cinétiques de relocalisation pour la mRFP-Lim et la GFP-myo-II dans les cellules HS1 sous un flux de 2,1 Pa sont montrées dans la Figure 9_9 (B et C). Les temps caractéristiques pour la mRFP-Lim dans ces cellules reflètent l'asymétrie de ces courbes de relocalisation qui sont proches des courbes obtenues avec la Lim-GFP dans les cellules sauvages (données de la Fig. 9_6) : 45 sec pour chacune des croissances, la décroissance est légèrement plus lente pour la mRFP-Lim avec un temps caractéristique de 36 sec comparé à 24 sec pour la décroissance du ratio de fluorescence de la Lim-GFP. Les courbes de relocalisation de la GFP-myo-II sont similaires dans les mutants avec un seul marqueur (Fig. 9_8) ou avec deux marqueurs (Fig. 9_9). Dans les deux cas, elles sont symétriques. La relocalisation de cette protéine est légèrement plus lente dans les cellules doublement marquées avec des temps caractéristiques de 68 et 88 secondes pour la croissance et la décroissance respectivement comparés à 60 et 72 secondes pour les courbes correspondantes dans les cellules simplement marquées.

La comparaison des cinétiques de relocalisation de la GFP-myo-II et de la mRFP-Lim dans les cellules doublement marquées (Figs 9_9_B et C) montre que les cinétiques d'association de la mRFP-Lim et de la GFP-myo-II aux côtés opposés de la cellule sont rapidement similaires. Au contraire, le temps caractéristique de dissociation est beaucoup plus long pour la GFP-myo-II que pour la mRFP-Lim (68 sec comparé à 36 sec respectivement). La comparaison des cinétiques obtenues avec la Lim-GFP et la GFP-myo-II dans les cellules avec un seul marqueur (Figs 9_6 et 9_8) mènent aux mêmes observations.

Pour répondre à la question initiale, il m'a donc semblé indispensable de quantifier le déplacement du bord arrière. Pour ce faire, j'ai utilisé les images de fluorescence de la GFP-myo-II et ai calculé la position moyenne de ce bord (voir *Matériels et Méthodes*).

Le déplacement de l'arrière a été mesuré et moyenné à partir de 16 films de réorientation réalisés avec 11 cellules (Fig. 9_9_C, ligne épaisse). Sur chacun de ces 16 films, il apparaît que la mRFP-Lim s'accumule au nouveau front contre le flux avant que l'arrière ne commence à rétracter, excepté dans deux cas où les deux évènements ont lieu simultanément. Sur les courbes moyennes, on observe qu'entre 0 et 50 sec après le changement de sens du flux, le bord nouvellement aval bouge avec le flux, ceci probablement du fait 1) de l'apparition de la nouvelle direction des forces mécaniques du flux ce qui engendre brutalement une nouvelle résultante des forces sur la cellule et 2) d'une activité protrusive qui peut persister au front aval juste après le changement de sens. Ce mouvement se traduit par une décroissance de la position moyenne du bord aval étant donné que tous les axes de

rétraction sont arbitrairement dirigés contre le sens du nouveau flux (voir un tel axe dans la Fig. 9_9_A). Après 36 secondes, le ratio de mRFP-Lim augmente au nouveau front contre le flux (Fig. 9_9_B) et les cellules commencent à protruder contre le flux. La position moyenne du bord aval augmente après 51 secondes (voir la position moyenne du bord aval dans la Figure 9_9_C). Cette croissance indique la rétraction active de l'arrière et est associée à la poursuite de la croissance continue du ratio de fluorescence de la GFP-myo-II de 50 à 100 sec. La comparaison des Figures 9_9_B et 9_9_C montre clairement que le ratio de la mRFP-Lim augmente d'abord et cette augmentation est suivie par la rétraction de l'arrière environ 15 secondes plus tard (15 +/- 10 sec).

Ces résultats montrent que, lors du processus de réorientation de cellules à la suite de l'inversion du sens d'un flux hydrodynamique, l'émission de protrusions riches en actine au nouveau front contre le flux précède la rétraction, utilisant la myo-II, du bord arrière situé en aval.

X Résultats, troisième partie : Origine de la mécanosensibilité cellulaire

Dans cette partie, je tente de comprendre quelle protéine ou structure cellulaire est impliquée dans la détection et la mesure des forces mécaniques. Précisément, j'étudie, à l'aide de mutants myo-II-null, le possible rôle de la myosine-II dans la mécanosensibilité. Je montre que le front riche en Lim-GFP contre le flux est très probablement un site d'adhésion au substrat.

10.1 Rôle de la myosine-II dans la mécanosensibilité et relocalisation de l'actine sans myosine-II

Peu de choses sont connues à propos des structures cellulaires ou des molécules nécessaires pour sentir des forces mécaniques chez *Dictyostelium discoideum*.

La myosine-II qui confère au cortex une plus grande rigidité chez *Dictyostelium discoideum* (Shelden and Knecht, 1995 ; Laevsky and Knecht, 2003) et fournit les forces de traction utilisées lors du développement des points focaux d'adhésion dans les fibroblastes (Balaban et al., 2001) est un possible acteur pour sentir les forces mécaniques. Pour tester le rôle de la myosine-II dans la mécanosensibilité sous flux, j'ai utilisé des cellules myo-II-null (Ruppel et al., 1994) marquées avec la Lim-GFP.

Dans un premier temps, pour tester leur comportement global sous flux, un grossissement de 20x a été utilisé de manière à visualiser un nombre important de cellules simultanément. Ces cellules sont particulièrement allongées dans la direction d'un flux de 2,3 Pa, protrudent principalement contre le flux (Fig. 10_1) et sont caractérisées par un faible détachement en 10 minutes sous un flux de 2,3 Pa (moyenne de 17 +/- 12 % sur 7 expériences indépendantes). L'observation de leur mouvement montre que ces cellules dérivent avec le flux, malgré leur orientation contre le flux (présence de la majorité des protrusions contre le flux). Cette dérive est donc très probablement passive et n'est due qu'à un effet mécanique des forces exercées par le flux, les cellules exerçant des forces contre le flux et donc dans le sens opposé de leur mouvement de dérive.

Dans un deuxième temps, j'ai effectué les mêmes expériences de changement de sens du flux sous une contrainte de 2,1 Pa avec un grossissement de 100x, comme pour les cellules de la souche parentale (JH10).

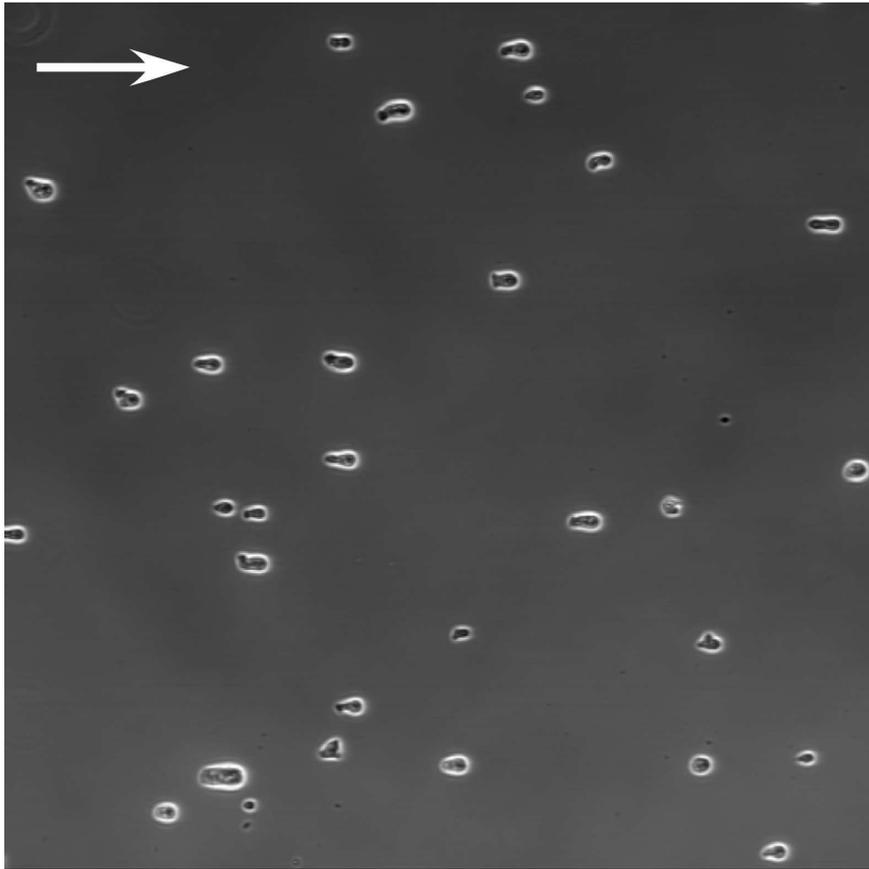


Figure 10_1: Les cellules myo-II-null sont particulièrement allongées dans la direction d'un flux de 2,3 Pa (flux indiqué par la flèche). Elles protrudent face au flux mais dérivent lentement et passivement dans la direction du flux.

Dans le panel A de la Figure 10_2, il est possible de voir une galerie d'images correspondant à une cellule, galerie illustrant le mode classique de réorientation avec ces cellules. Les films ont été analysés avec le même programme d'analyse de contours actifs et les courbes moyennes de relocalisation sont présentées dans le panel B de la Figure 10_2 et comparées aux courbes moyennes de relocalisation de la Lim-GFP obtenues avec les cellules JH10 (données de la Figure 9_6). Les courbes obtenues avec les deux souches cellulaires sont similaires et cela prouve que les cellules myo-II-null peuvent se réorienter après un changement de sens du flux et relocaliser la Lim-GFP aussi rapidement que les cellules JH10, suggérant ainsi que la myo-II n'est pas nécessaire à la mécanosensibilité. Le panel C de cette figure montre le graphe polaire de la redistribution de Lim-GFP dans les cellules myo-II-null (moyenne sur 10 cellules) suivant l'inversion du sens du flux de 2,1 Pa. Clairement, la Lim-GFP s'accumule exclusivement face au flux dans ces cellules myo-II-null, de manière similaire aux cellules sauvages.

Pour confirmer l'impression de fort allongement dans la direction du flux, j'ai quantifié l'élongation de chaque type cellulaire. Les cellules myo-II-null sont en effet très allongées dans la direction du flux (moyenne de l'élongation de $0,98 \pm 0,25$, $n = 19$)

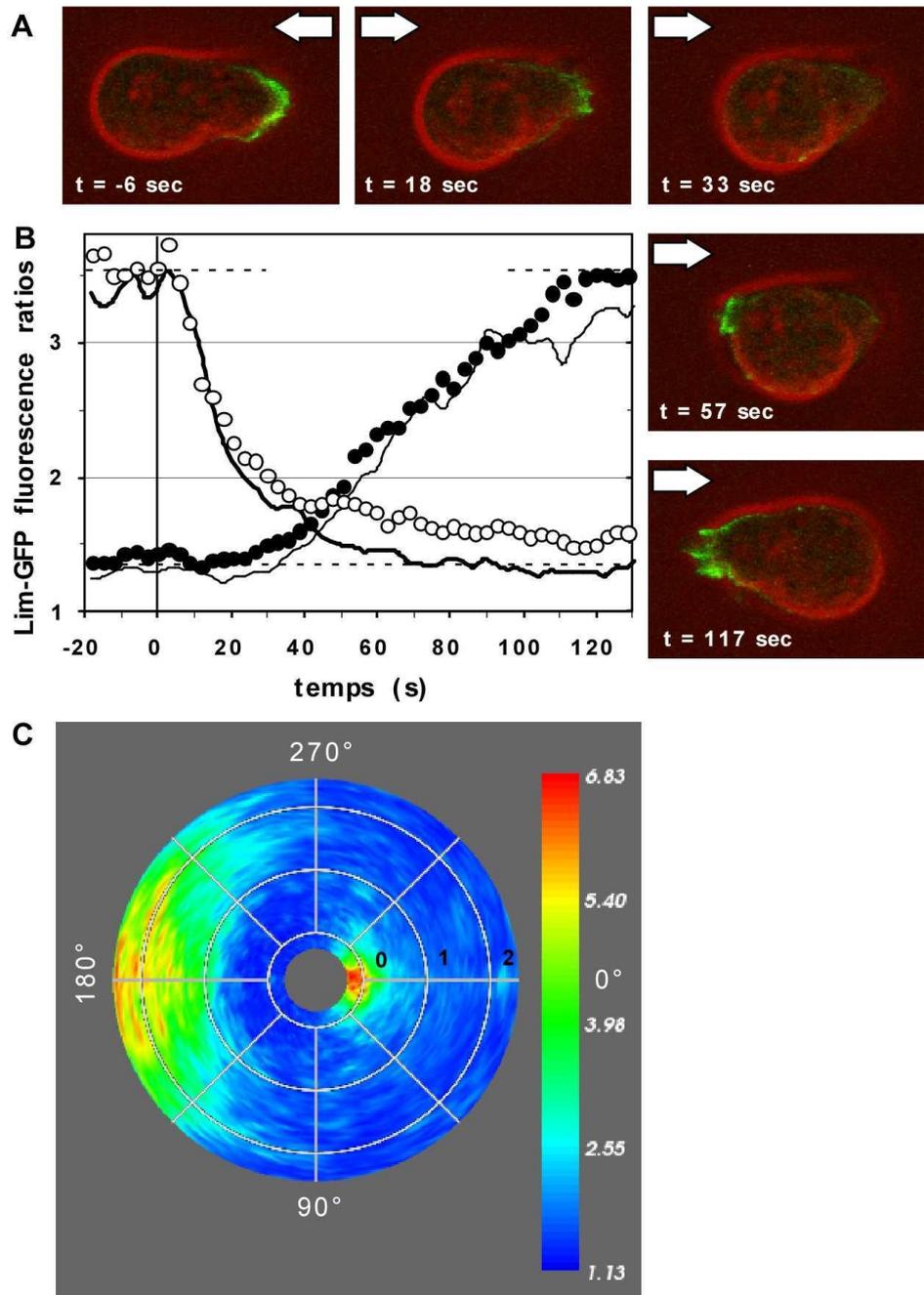
comparativement aux cellules sauvages qui ont une forme plus ronde (moyenne de l'élongation de $0,71 \pm 0,20$, $n = 16$; différence $P <$).

Figure 10_2:

Cellules HS1 (myosin-II-null) exprimant la Lim-GFP et soumises à un flux de 2,1 Pa dont la direction est inversée.

A) Galerie de photos prises en microscopie confocale montrant la distribution de la Lim-GFP dans une cellule myo-II-null avant et après un changement de sens du flux (effectué à $t = 0$). Les flèches indiquent la direction du flux. Vert: fluorescence Lim-GFP. Rouge: contraste de phase.

B) Cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP. Les courbes moyennes des ratios de fluorescence de la Lim-GFP des côtés cellulaires aval et amont sont dessinées en fonction du temps relativement au changement de sens du flux (moyennes sur 22 réorientations avec 14 cellules).



Les cercles creux et pleins correspondent aux bords aval et amont, après le changement de sens du flux, respectivement.

Les lignes pointillées indiquent les plateaux inférieurs et supérieurs pour les ratios de fluorescence de chaque côté. Les cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP (sous 2,1 Pa) obtenues dans la souche parentale JH10 sont aussi montrées, pour comparaison, en lignes pleines (données de la Figure 9_6).

C) Graphe polaire moyen pour le ratio de fluorescence de la Lim-GFP dans les cellules myo-II-null sous 2,1 Pa. Le graphe est la moyenne des graphes de 22 expériences d'inversion du flux réalisées avec 14 cellules. Le premier anneau blanc au centre coïncide avec l'inversion de la direction du flux. Le temps est indiqué en minutes. L'échelle de couleurs indique les valeurs des ratios de fluorescence.

Enfin, la stabilité dans le temps de l'orientation contre le flux des cellules myo-II-null a été testée en soumettant ces cellules à un flux constant de 2,1 Pa pendant au moins 6 minutes. Dans 17 cas sur 24 tests (71 %), les cellules myo-II-null ont maintenu leur orientation stable contre le flux pendant au moins 6 minutes et pour certaines pendant même plus de 11 minutes. Comparé aux données obtenues avec les cellules parentales, cela prouve que les cellules myo-II-null maintiennent leur forme polarisée orientée contre des forces hydrodynamiques de manière plus stable dans le temps que les cellules sauvages.

10.2 Le front riche en Lim-GFP contre le flux est un site d'adhésion au substrat

Il n'est pas rare d'observer des cellules sauvages (JH10) qui dérivent passivement avec le flux quand elles ne sont pas polarisées. Toutes les cellules observées dans cette situation (8 cellules sauvages) ont ralenti ou complètement stoppé leur dérive avec le flux dès qu'elles ont émis des nouvelles protrusions fluorescentes riches en Lim-GFP contre le flux (Fig. 10_3).

20 cellules sauvages et 9 cellules myo-II-null se sont détachées du substrat et ont été emportées par le flux après avoir perdu, entre 1 et 30 secondes plus tôt, leur front contre le flux riche en Lim-GFP. Deux séquences typiques illustrant cette observation peuvent être vues dans la Figure 10_4. Au contraire, seulement 5 cellules sauvages et une cellule myo-II-null se sont détachées alors qu'elles étaient encore polarisées avec des protrusions contre le flux. Ceci suggère que le détachement cellulaire est associé à la perte du côté protrusif contre le flux.

Immédiatement après un changement de sens du flux, 7 cellules (trois sauvages et quatre myo-II-null) ont montré un mouvement de rotation autour du côté protrusif, fixe par rapport au substrat, alors que tout le reste de leur corps dérivait avec le flux. Une séquence typique est montrée dans la Figure 10_5. Le fait que le bord protrusif (riche en Lim-GFP) coïncide, après le changement de sens du flux, avec le seul point de la cellule fixe par rapport au substrat, suggère fortement que ce front avant joue un rôle dans l'attachement de la cellule au substrat.

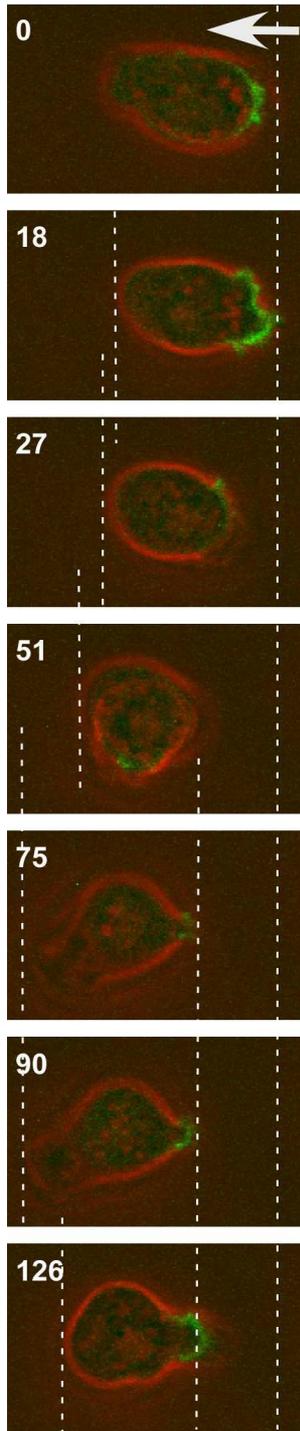


Figure 10_3: Dès que la cellule perd son front contre le flux (image à 27 sec), la cellule dérive avec le flux. A 75 sec, une nouvelle protrusion apparaît contre le flux. Elle reste fixe par rapport au substrat et la cellule stoppe sa dérive et rétracte son bord arrière (voir ligne pointillée). La flèche indique la direction du flux. Le temps est indiqué en secondes. En rouge : le contraste de phase. En vert : la Lim-GFP.

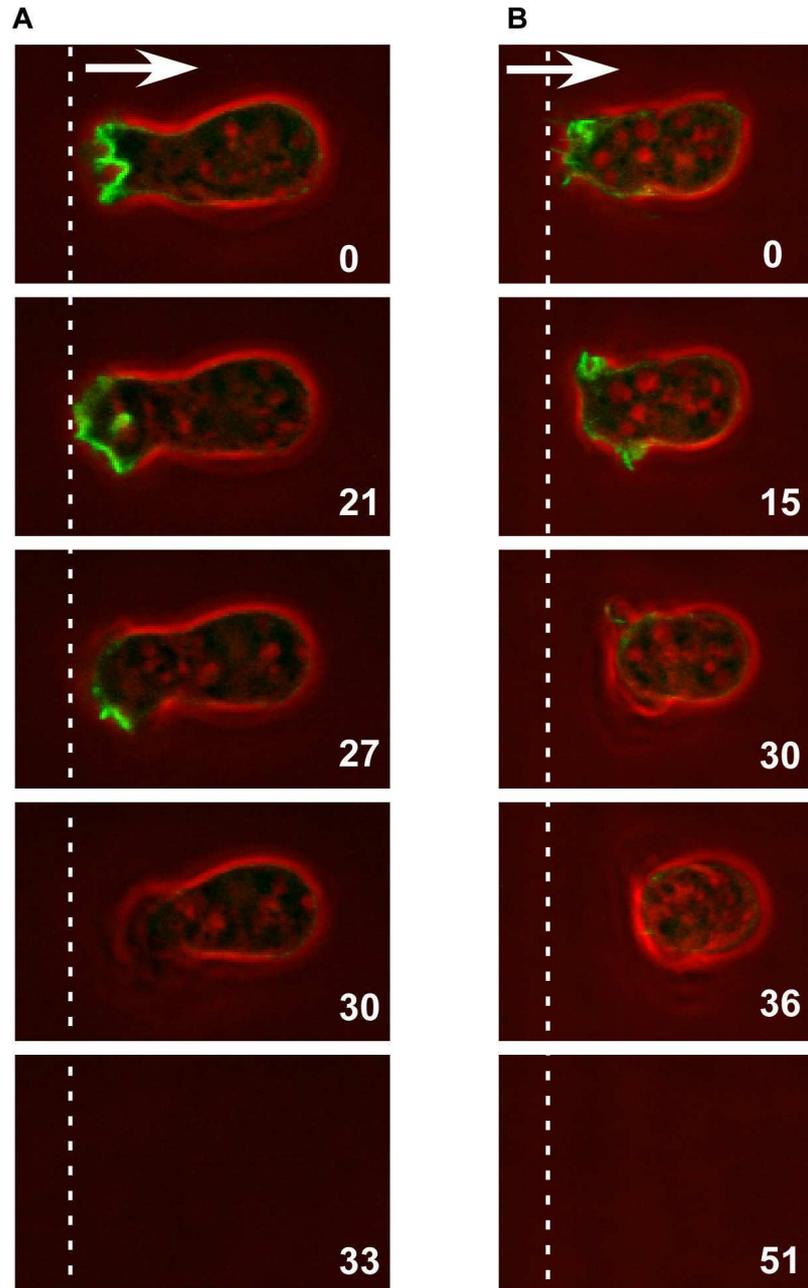


Figure 10_4: Exemples de cellules typiques qui décollent après avoir perdu leur front contre le flux. En rouge : contraste de phase, en vert : Lim-GFP. Le temps est indiqué en secondes. Les flèches indiquent la direction du flux.

A) La cellule voit son pseudopode entraîné sur le côté, avant de décoller.

B) Le front avant est poussé au-dessus de la cellule, en volume, ce qui entraîne le décollement de la cellule.

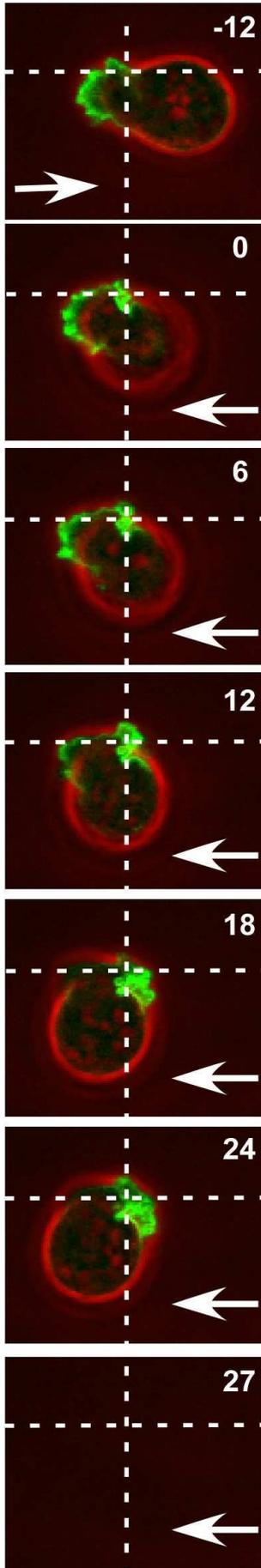


Figure 10_5: Après un changement de sens du flux (à $t = 0$), la cellule expérimente un mouvement de rotation autour d'un point fixe (intersection des deux lignes pointillées) par rapport au substrat. Le reste du corps cellulaire est emporté dans la direction du flux. Ce point fixe par rapport au substrat coïncide avec le front avant fluorescent riche en actine filamenteuse. La cellule finit par se détacher du substrat. Les flèches indiquent la direction du flux. Le temps est indiqué en secondes. En rouge : contraste de phase, en vert : fluorescence de Lim-GFP.

D'autre part, la base des pseudopodes contre le flux (marqués par la Lim-GFP) se situe très près du substrat comme illustré dans la Figure 10_6. Ceci a pu être observé en réalisant des sections à différentes altitudes (z-sectionning) sur 14 cellules orientées de manière stable contre un flux constant. Les sections horizontales ont été enregistrées tous les microns selon l'axe vertical. Le niveau du substrat est défini comme le plan de mise au point obtenu juste sous la cellule dès que la fluorescence disparaît. La section suivante au-dessus, qui montre de la fluorescence est alors prise entre 0 et 1 μm au-dessus du substrat (cette section est notée « 1 μm » sur la Figure) et la troisième section entre 1 et 2 μm , etc. Les pseudopodes fluorescents face au flux s'étendent de 0 à plus de 2 μm au-dessus du substrat. Ces sections montrent clairement que la base du réseau dense d'actine filamenteuse qui constitue les pseudopodes se trouve en contact rapproché avec le substrat, plus précisément entre 0 et 1 μm au-dessus du substrat de verre à la fois pour les cellules sauvages et les mutants *myo-II-null*, comme cela est montré avec deux exemples typiques (Fig. 10_6). Deux reconstructions selon un plan vertical sont également montrées dans le panel C de cette figure.

Tous ces résultats suggèrent fortement une interaction étroite entre la base du front avant contre le flux et le substrat.

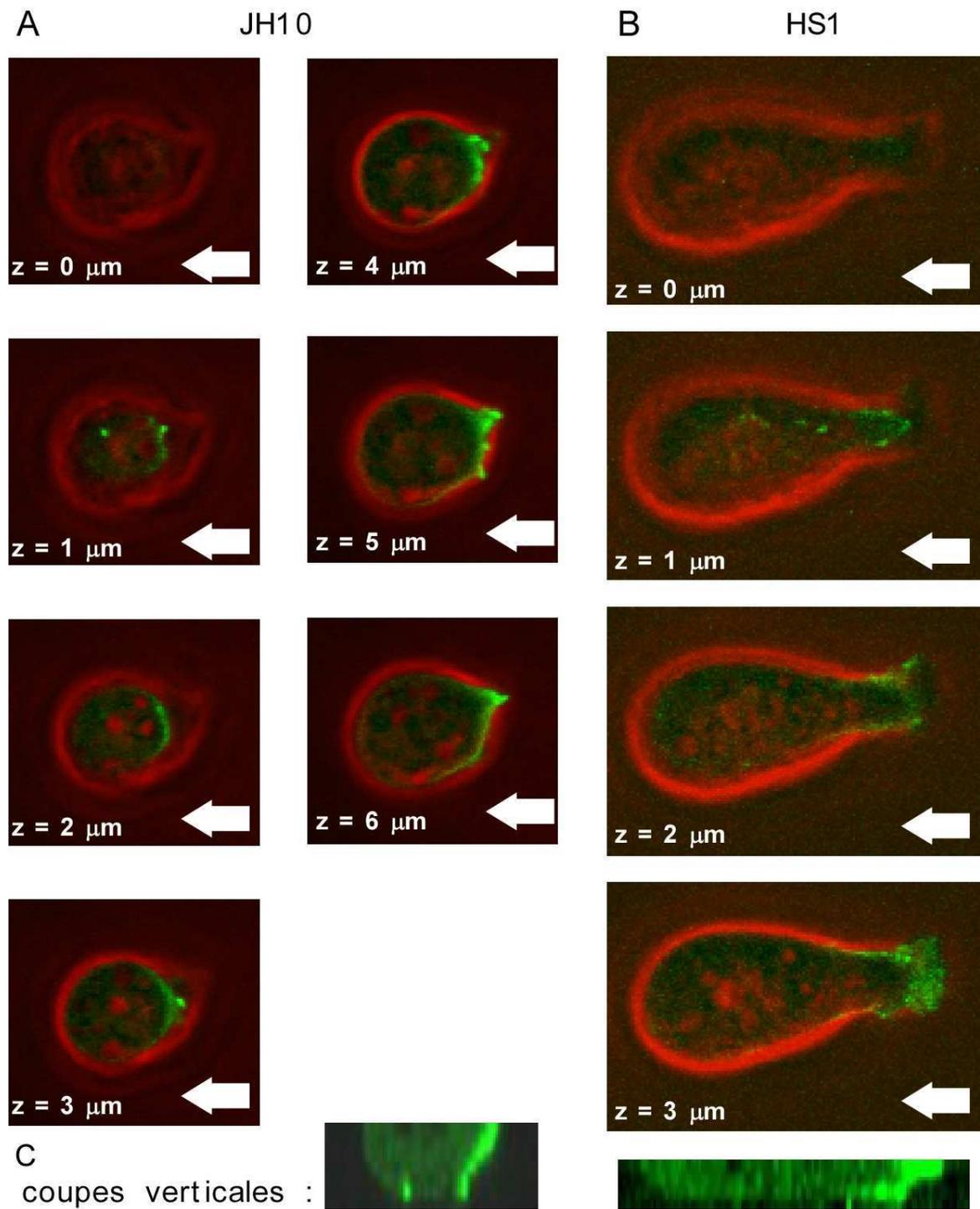


Figure 10_6: La base du pseudopode face au flux interagit avec le substrat.

Cellules JH10 (panel A) ou HS1 (panel B) exprimant la Lim-GFP et soumises à un flux hydrodynamique constant ($\sigma = 2,1 \text{ Pa}$). Des sections sont réalisées en microscopie confocale pour enregistrer la distribution de Lim-GFP à différentes hauteurs selon un axe perpendiculaire au substrat. Les sections sont enregistrées tous les microns. Les hauteurs sont indiquées en microns pour chaque image. Les flèches représentent la direction du flux constant. Vert: Lim-GFP. Rouge: contraste de phase.

C) Reconstructions dans un plan vertical de la distribution de Lim-GFP selon le profil cellulaire au-dessus du substrat, pour chacune des deux cellules et à partir des photos des panels A et B.

XI Résultats, quatrième partie : Réorganisation du cytosquelette et réorientation cellulaire en réponse à un stimulus chimique. Comparaison au cas sous flux

Dans cette partie, j'observe et quantifie la réorganisation du cytosquelette de cellules différenciées lors de l'inversion d'un gradient chimique de chimioattractants (déplacement de l'extrémité de la micropipette libérant les chimioattractants de l'avant à l'arrière d'une cellule en migration). Je compare les cinétiques de relocalisation de protéines obtenues dans ces conditions au cas sous flux.

Les cellules *Dictyostelium discoideum* ont beaucoup été utilisées pour étudier le chimiotactisme. Les voies de signalisation impliquées dans cet organisme en réponse à un signal chimique sont très documentées (voir la partie *Introduction*).

Au contraire, les voies de signalisation menant à la réponse mécanosensible de cet organisme ont très peu été étudiées. La question très naïve qui vient alors naturellement à l'esprit consiste à se demander dans quelle limite, il est possible de généraliser les résultats connus pour le chimiotactisme au cas de la migration sous un flux hydrodynamique et de la réponse mécanosensible.

Sans vouloir répondre à cette question qui nécessiterait de nombreuses recherches en biologie cellulaire et moléculaire, nous avons voulu comparer les comportements de réorientation et les cinétiques de relocalisation de protéines dans le cas d'une réponse chimiotactique et dans le cas d'une réponse mécanosensible sous flux.

En utilisant les cellules HS1 doublement marquées pour la GFP-myo-II et la mRFP-Lim et carencées de manière à les rendre agrégation-compétentes, j'ai donc réalisé des expériences de chimiotactisme en déplaçant la micropipette remplie d'AMPC à l'arrière d'une cellule en migration de manière à la forcer à se réorienter en inversant sa polarité.

Une série typique d'images lors de ce processus de réorientation cellulaire après l'inversion du gradient chimique est présentée dans la Figure 11_1.

L'observation de ce genre d'enregistrements permet de faire doré et déjà des comparaisons qualitatives avec les expériences sous flux. Tout d'abord, il apparaît que lors de l'inversion du gradient chimique en plaçant la pipette près de l'arrière de la cellule, tout comme lors de l'inversion de la direction d'un flux de 2,1 Pa, les cellules se réorientent la plupart du temps en inversant leur polarité de sorte que l'ancien front avant devient le nouveau front arrière et inversement. La cellule, lorsqu'elle inverse sa polarité, passe, dans les deux types d'expériences, par une phase de minimum de polymérisation de l'actine. Suite à cette phase, de nouvelles protrusions apparaissent du côté du nouveau front avant et l'arrière accumule de plus en plus de myosine-II pour rétracter.

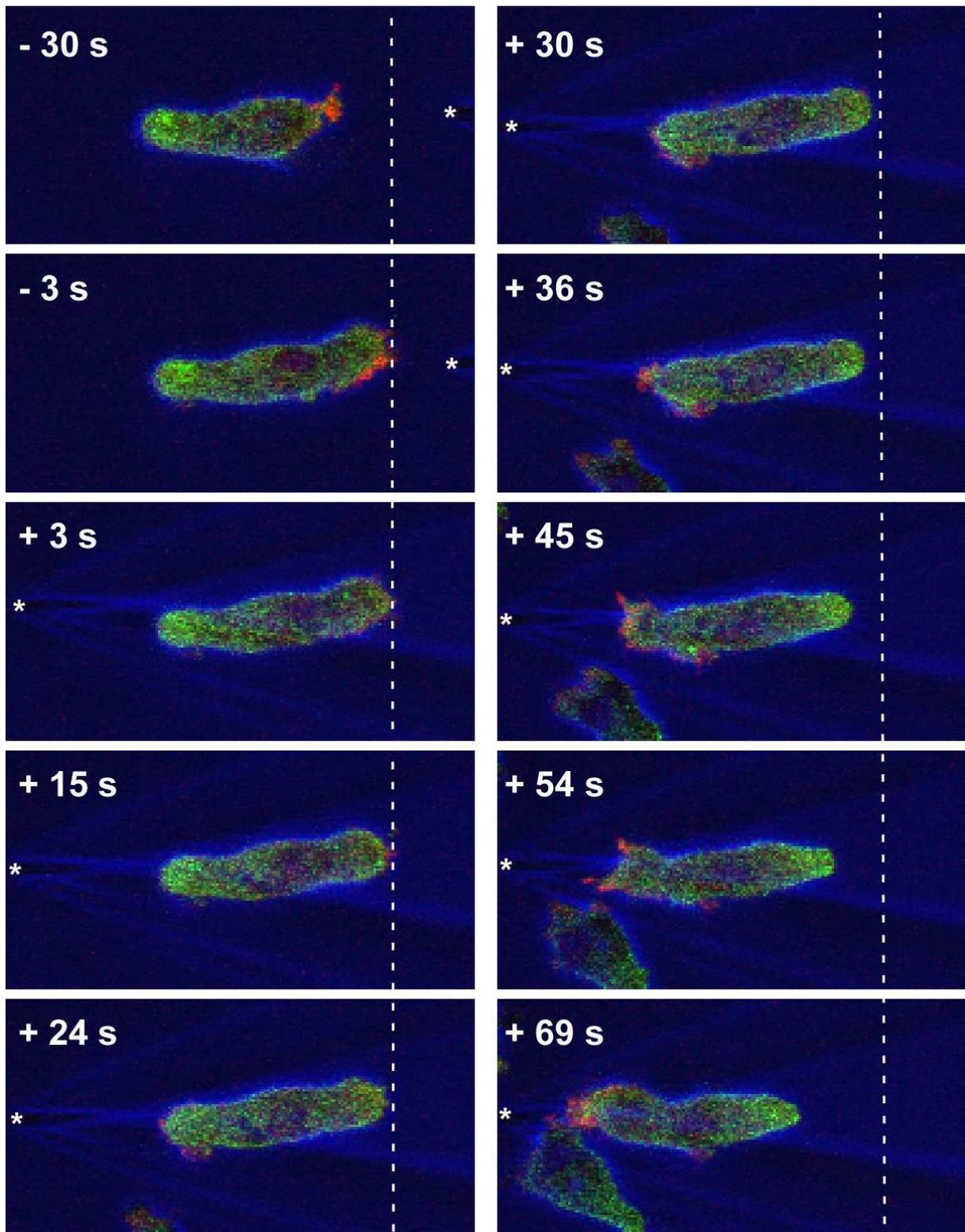


Figure 11_1: Exemple d'une cellule HS1 exprimant à la fois la GFP-myo-II (vert) et la mRFP-Lim (rouge). La cellule est agrégation-compétente et répond à un stimulus chimique généré par un gradient d'AMPC. Elle migre rapidement vers l'extrémité de la pipette. Celle-ci est déplacée à $t = 0$ à l'arrière de la cellule. La cellule se réoriente en inversant sa polarité. L'astérix représente le bout de la micropipette, qui est aussi visible en contraste de phase (bleu). Le temps est indiqué en secondes relativement au déplacement de la micropipette. La ligne pointillée indique la position la plus à droite atteinte par le bord cellulaire.

Durant la phase de minimum de l'activité protrusive, la myosine-II semble distribuée tout autour du cortex cellulaire (photos à + 15 et + 24 sec de la Figure 11_1) comme cela était le cas sous flux.

De manière à comparer plus quantitativement les expériences de réorientation dans un gradient chimique et sous flux, nous avons réalisé les mêmes analyses utilisant le programme de détection par contours actifs et avons quantifié les redistributions des protéines fluorescentes marquant l'actine et la myosine-II.

Les courbes de relocalisation de la mRFP-Lim et de la GFP-myo-II obtenues lors de l'inversion du gradient chimique sont présentées dans la Figure 11_2.

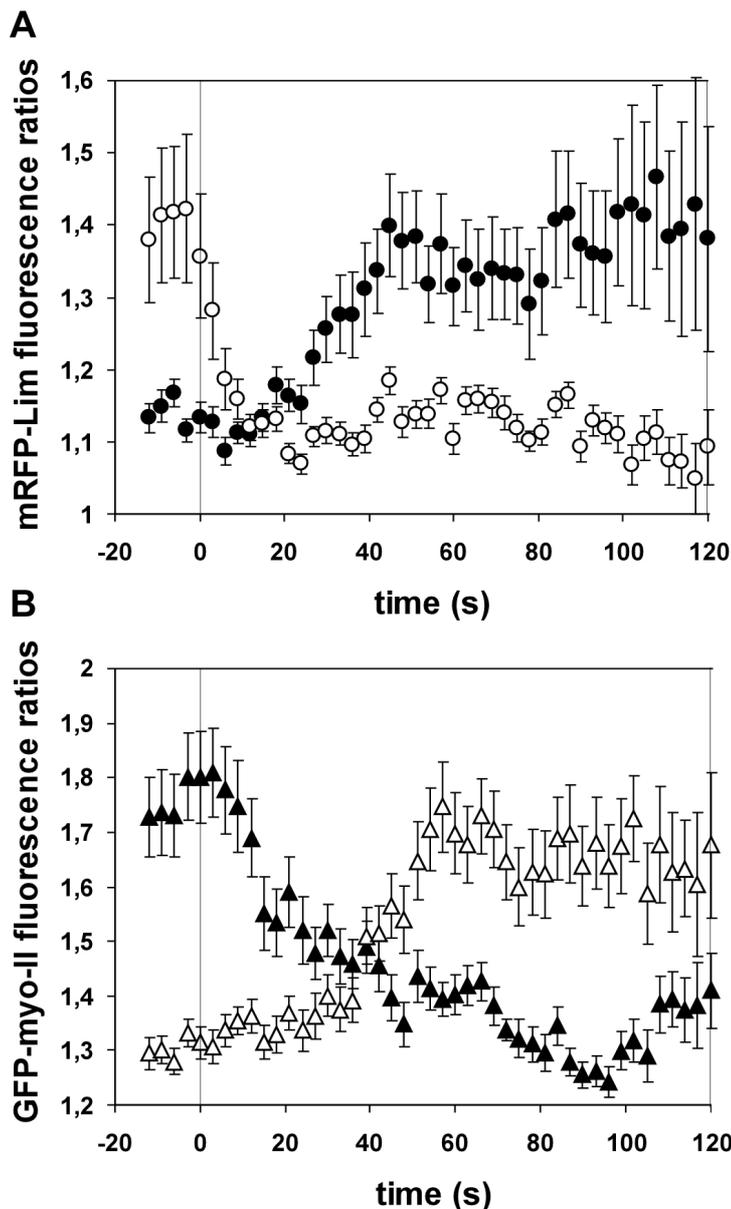


Figure 11_2: Courbes moyennes (19 réorientations avec 14 cellules) de relocalisation de la mRFP-Lim (**A**) et de la GFP-myo-II (**B**) après l'inversion d'un gradient chimique (à $t = 0$). Les symboles creux (respectivement pleins) sont associés au bord cellulaire nouvellement aval (respectivement amont) par rapport au gradient chimique. Les barres d'erreur sont de la taille de l'erreur standard sur la moyenne.

L'observation des morphologies de ces courbes permet encore des comparaisons qualitatives entre les deux types de stimuli. En effet, comme cela est le cas sous flux, les courbes de relocalisation de la mRFP-Lim sont asymétriques avec une rapide décroissance au

nouveau front aval du gradient chimique et une croissance plus lente du côté du nouveau front proche de la source de chimioattractant. Les courbes de relocalisation de la GFP-myo-II sont plus symétriques et se croisent pour des ratios de chaque côté de la cellule environ à égale distance des plateaux inférieur et supérieur, ce qui correspond à une cellule qui a alors de la myo-II uniformément répartie tout autour de son cortex. Cela est d'ailleurs vérifié en visualisant le graphe polaire de la redistribution de la GFP-myo-II (panel B de la Figure 11_3). On voit bien qu'entre 25 et 50 secondes, ce graphe polaire montre des cercles colorés en bleu turquoise/vert sur tout son périmètre (valeurs intermédiaires des ratios autour de 1,4/1,55).

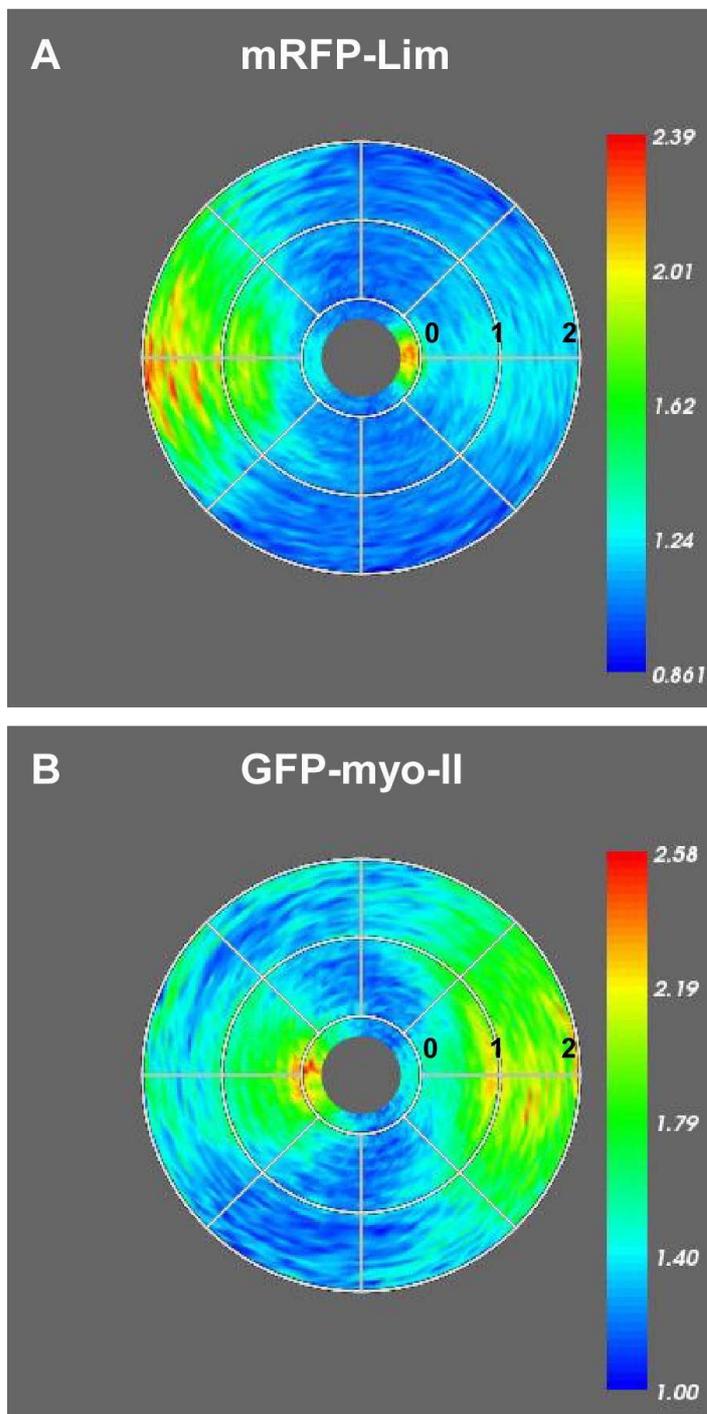


Figure 11_3: Graphes polaires moyens pour le ratio de fluorescence de la mRFP-Lim (A) et de la GFP-myo-II (B) de cellules HS1 doublement marquées et placées dans un gradient d'AMPC dont la direction est inversée à $t = 0$.

Ces graphes montrent la dynamique de redistribution dans l'espace et le temps des protéines mRFP-Lim (A) et GFP-myo-II (B) exprimées simultanément dans la même cellule, en réponse à l'inversion du gradient de chimioattractants. Le premier anneau blanc au centre coïncide avec l'inversion de la direction du gradient. Le temps est indiqué en minutes. Les codes de couleurs indiquent les valeurs des ratios.

Au contraire, le graphe polaire de la redistribution de la mRFP-Lim (panel A de la Figure 11_3) illustre l'existence d'une phase où la polymérisation de l'actine est très faible (contours circulaires bleus/bleus turquoise sur tout leur périmètre entre environ 0 et 25 secondes, c'est-à-dire ratios autour de 1,1-1,2).

Tous ces résultats obtenus lors de la réorientation cellulaire dans un gradient chimique sont qualitativement très proches de ceux obtenus après un changement de sens du flux.

D'un point de vue des cinétiques, il semble que la redistribution de mRFP-Lim est plus rapide dans un gradient d'AMPC que sous un flux de 2,1 Pa ou de 0,9 Pa (Fig. 11_4). En effet, la croissance du ratio de mRFP-Lim débute plus tôt (environ après 20-25 sec) que sous un flux de 2,1 Pa (après 30 secondes) et le plateau supérieur est atteint plus rapidement en moins d'une minute (Fig. 11_2_A) comparé à environ 90 secondes sous une contrainte hydrodynamique de 2,1 Pa. De plus, la dissociation de la mRFP-Lim du bord nouvellement aval du gradient est très rapide, plus rapide que sous flux, alors que celle sous flux est déjà qualifiée de rapide. Il apparaît donc que le nouveau signal d'AMPC provoque une réorganisation du cytosquelette encore plus rapide que sous flux.

Sous un flux de 0,9 Pa, la croissance du ratio de Lim-GFP commence dès 15 secondes après le changement de sens du flux, ce qui est proche de la mesure sous un stimulus chimiotactique. Le plateau supérieur est atteint à peu près en même temps (en 50-60 sec). La décroissance de mRFP-Lim lors de la réorientation dans un gradient chimique reste beaucoup plus rapide que celle sous un flux de 0,9 Pa qui est similaire à celle sous 2,1 Pa.

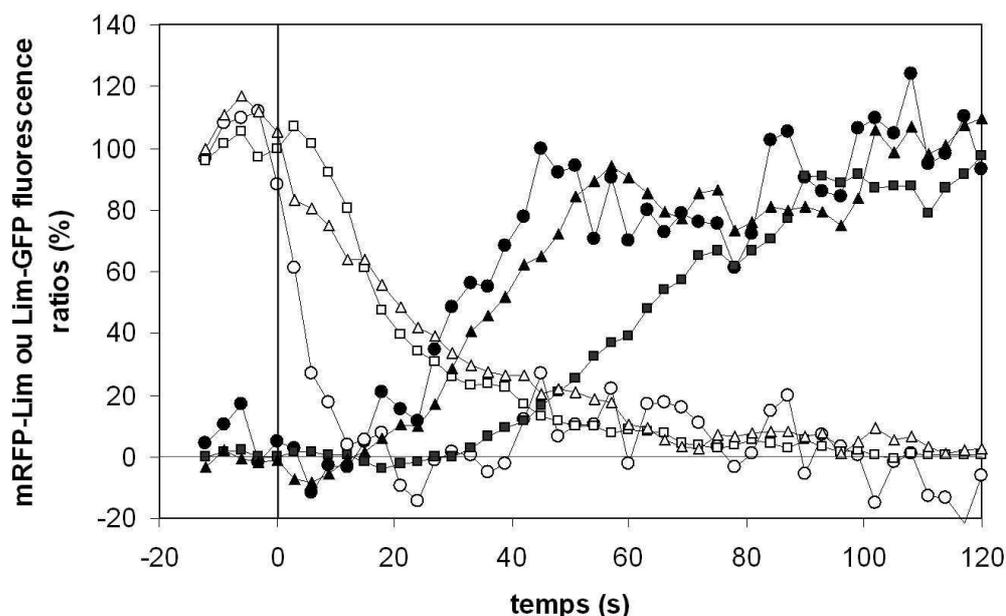


Figure 11_4: Courbes moyennes de relocalisation de la Lim-GFP dans des cellules JH10 sous un flux de 0,9 Pa (triangles) ou sous un flux de 2,1 Pa (carrés) et de la mRFP-Lim dans les cellules HS1 doublement marquées agrégation-compétentes après inversion d'un gradient de chimioattractants (cercles). Les ratios de fluorescence sont normalisés.

XII Discussion

Lors de ce travail de thèse, j'ai étudié le comportement de cellules soumises à un flux hydrodynamique ou à un gradient de chimioattractants. J'ai observé leur polarisation, leur orientation, et leur réorientation après un changement de sens du flux ou après l'inversion du gradient chimique. Dans cette partie, je reprends mes résultats, les analyse et les discute à la lumière de travaux rapportés dans la littérature.

12.1 Différents types de motilités

12.1.1 Différentes motilités de *Dictyostelium discoideum* sous flux et dans un gradient chimique. Influence des conditions de culture

La première partie de mon travail a consisté à comprendre le comportement « global » (motilité avec ou contre le flux, vitesses, orientation, détachement, morphologies particulières) sous flux de différentes souches cellulaires soumises à différents taux de cisaillement et à différents traitements (comme, par exemple, la privation de nourriture). Elle m'a ainsi permis de mettre en évidence l'existence de différents comportements sous flux et de comprendre quels paramètres influent et de quelle manière sur la motilité de cellules soumises à des forces hydrodynamiques.

En particulier, il ressort de ces résultats que le temps passé en culture et la manière de cultiver les cellules (sur boîte de Pétri ou en fiole agitée) influent sur le comportement sous flux : à condition que les cellules soient cultivées en fiole agitée, on observe que plus la période de conservation en culture dans un milieu axénique est longue, plus les cellules ont tendance à migrer dans le sens de l'écoulement et avec des vitesses de plus en plus grandes (pour atteindre une vitesse moyenne avec les cellules AX2M de $4,4 \pm 2,5 \mu\text{m}/\text{min}$ après 2 mois en culture dont 7 à 8 semaines en agitée, comparée à $1,6 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$ pour les mêmes cellules cultivées moins de deux semaines).

L'état de développement et la manière de priver les cellules de nourriture (en PB ou sur boîte de gel recouverte initialement de bactéries) affectent aussi la motilité sous flux : pour des cellules privées de nourriture pendant plusieurs heures en PB, on observe un détachement total en une minute sous un flux de 2,3 Pa, alors qu'en carençant les cellules sur boîte de gel avec bactéries, on n'observe plus que 60 % de détachement en 10 minutes sur les cellules

prélevées dans les courants d'agrégation. De plus, de 22 à 40 % de ces cellules (selon la souche cellulaire AX2M ou NC4) montrent une motilité fluide et rapide avec le flux.

En intégrant les connaissances sur le chimiotactisme (résultats déjà connus avant cette thèse, voir *Introduction*), on observe donc cinq grands types de motilités de *Dictyostelium discoideum* qui sont résumés dans le tableau 12_1.

conditions de culture \ stimulus	Flux hydrodynamique	Pipette de chimioattractant (folate ou AMPc)
Cellules cultivées moins de deux semaines en milieu axénique	Cellules polarisées et orientées contre le flux (quasi pas de mouvement, résistance contre le flux)	Folate : motilité vers la source de folate (Yumura, 1994) AMPc : pas de réponse
Cellules cultivées en fiole agitée plus de 7 semaines	Cellules polarisées et orientées avec le flux (motilité induite par le flux), déjà connu: Décavé et al., 2003 ; Fache et al., 2005	Pas testé
Cellules privées de nourriture en PB	100 % de détachement en une minute sous une contrainte de 2,1 Pa	AMPc : motilité fluide et rapide vers le bout de la pipette (Gerisch, 1982)
Cellules privées de nourriture sur boîte de gel recouverte initialement de bactéries et prélevées dans les courants d'agrégation	Motilité fluide et rapide avec le flux des cellules qui restent allongées (formes typiques de cellules privées de nourriture)	AMPc : motilité vers le bout de la pipette (Gerisch, 1982)

Tableau 12_1: Les différentes motilités de *Dictyostelium discoideum*. 5 motilités différentes peuvent être distinguées selon le stimulus appliqué (cisaillement hydrodynamique ou gradient chimique) et les conditions de culture. Les 5 types de motilités répertoriées apparaissent dans 5 couleurs différentes. En gras (rouge, orange et noir) apparaissent les deux types de motilités que j'ai mis en évidence lors de cette thèse, ainsi que la mise en lumière de la faible adhésion de cellules carencées en PB.

On a donc cinq types de motilité des cellules *Dictyostelium* :

- 1) **cellules végétatives orientées contre un flux**
- 2) cellules végétatives qui migrent avec le flux
- 3) cellules végétatives qui migrent vers une source de folate (chimiotactisme)

- 4) cellules carencées plusieurs heures qui migrent vers une source d'AMPc (chimiotactisme)
- 5) **cellules carencées sur une boîte de gel recouverte initialement de bactéries et prélevées dans les courants d'agrégation, qui, lorsqu'elles conservent leur morphologie allongée (22 à 40 % d'entre elles), avancent avec le flux.**

Pour s'assurer de l'homogénéité des populations cellulaires utilisées dans toute la suite du travail, les cultures n'ont pas été conservées au-delà de 15 jours suivant la décongélation et une nouvelle culture a été démarrée tous les 7-15 jours à partir d'un stock congelé de cellules ou préférentiellement de spores.

12.1.2 Différentes motilités sous flux de différents organismes. Migration dans le sens des forces ou contre les forces

Comme nous venons de le voir, les cellules *Dictyostelium* peuvent s'orienter contre ou migrer avec le flux en fonction de l'ancienneté de la culture cellulaire utilisée.

Les études de la motilité sous flux de cet organisme avaient préalablement établi que ces cellules avançaient avec le flux dans une fenêtre étendue du taux de cisaillement (Décavé et al., 2003). Plus récemment, Fache et al. (2005) ont montré que ces cellules étaient douées de motilité soit avec soit contre le flux en fonction de plusieurs paramètres comme la contrainte de cisaillement (Fig. 6_73 de l'*Introduction*), ou la durée d'application du flux (voir Figure 3B de Fache et al., 2005). De plus, sous un flux donnant une valeur nulle de la directionnalité (entre environ 0,6 et 0,8 Pa), les auteurs remarquent que la migration n'est pas aléatoire, mais au contraire bi-directionnelle. Ceci met en évidence que d'autres paramètres que ceux vus plus haut et non encore déterminés influent sur la décision des cellules de migrer contre ou avec le flux. Il semble raisonnable de supposer que l'activité protrusive, l'adhésion cellule-substrat et/ou la vitesse de restauration du contact cellule-substrat font partie de ces paramètres non encore identifiés qui influent sur le comportement sous flux.

Dans d'autres types cellulaires soumis à des forces mécaniques extérieures, les deux comportements ont été observés : les fibroblastes opposent de la résistance aux forces extérieures en renforçant les points focaux d'adhésion (Choquet et al., 1997 ; Riveline et al., 2001), alors qu'un écoulement laminaire induit la migration de cellules endothéliales dans la direction du flux (Li et al., 2002). Ces exemples mettent en évidence la diversité des réponses à l'application de forces mécaniques.

12.2 Réorganisation du cytosquelette d'actine sous flux

Dans la deuxième partie de mon travail, j'ai étudié la réorganisation du cytosquelette en observant sur cellules uniques la réponse à un écoulement laminaire. Pour s'assurer de l'homogénéité des populations cellulaires, les cultures ont été utilisées dans les 15 jours suivant la décongélation et une nouvelle culture a été démarrée au minimum toutes les deux semaines à partir d'un stock de cellules ou préférentiellement de spores. Dans ces conditions, la souche sauvage parentale, JH10, et tous les mutants dérivés de cette souche se sont orientés de manière consistante contre le flux pour des taux de cisaillement compris entre 0,9 et 2,3 Pa.

Dans le but de visualiser en fort grossissement la réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à des taux de cisaillement variables, j'ai conçu une nouvelle chambre à flux et un circuit de tuyaux à base de tubes rigides et de vannes de manière à pouvoir changer le sens du flux en moins d'une seconde. De plus, grâce à l'utilisation de protéines de fusion fluorescentes en tant que marqueurs de la polymérisation de l'actine et de la contraction due à la myosine-II, et grâce à un programme d'analyse d'images (Dormann et al., 2002), nous avons été capables de quantifier la redistribution hautement dynamique de protéines dans la cellule. Les graphes polaires ont été un outils pratique pour moyennner sur plusieurs cellules la relocalisation spatio-temporelle des protéines.

Différents taux de cisaillement ont été principalement utilisés pour cette étude de la réorganisation du cytosquelette sous flux (0,9 et 2,1 Pa) qui correspondent à des forces globales exercées sur chaque cellule d'environ 90 à 210 pN (Décavé et al., 2002). Ces forces sont de l'ordre de celles produites par des cellules *Dictyostelium* (environ 1000 pN pour des cellules sauvages ; Fukui et al., 2000).

L'actine et la myosine-II ont déjà été observées dans des cellules *Dictyostelium* en division ou en migration (Rubino et al., 1984; Yumura et al., 1984; Neujahr et al., 1997; Yumura and Fukui, 1998). Cependant la redistribution simultanée des deux protéines dans le processus de réorientation suivant un changement de sens du flux ou l'inversion d'un gradient chimique n'a jamais été étudiée. Ces observations dans la même cellule ne sont possibles aujourd'hui que grâce au développement de nouveaux marqueurs fluorescents ainsi qu'au développement de chambres à flux répondant à un cahier des charges exigeant.

12.2.1 Polarisation et orientation des cellules soumises à un flux

Les expériences alternant entre « l'arrêt du flux » et « l'application d'un flux de 2,1 Pa » ont permis de montrer que les cellules sauvages, qui, sans stimulus, migrent aléatoirement dans toutes les directions, créent rapidement un front protrusif contre le flux en une minute (voir Figure 9_2). On a donc des cellules qui sont polarisées : présence d'un front avant marqué par la Lim-GFP avec de nouvelles protrusions et, du côté opposé, d'un front sans protrusion et de forme arrondie caractéristique du front arrière. Ces cellules polarisées sont aussi orientées : en effet, le front avant protrusif se retrouve face aux forces mécaniques exercées par le flux. On a donc un double effet du flux : le flux polarise et oriente les cellules. Cette orientation en réponse à une contrainte de cisaillement de 2,1 Pa est stable dans le temps et est maintenue pendant plusieurs minutes. Ces résultats confortent l'existence de mécanisme(s) mécanosensible(s) chez l'amibe comme cela a été suggéré dans d'autres études (Décavé et al., 2003; Fache et al., 2005) et indiquent que les forces mécaniques du flux activent une ou plusieurs voies de signalisation menant à la polymérisation de l'actine et ainsi à une activité protrusive contre le flux.

Dans certains cas, il arrive qu'une cellule perde sa polarité, par exemple, lors d'une phase de contraction (phases qui apparaissent aussi avec des cellules non stimulées migrant aléatoirement (Schindl et al., 1995)) ou perde seulement son orientation (tout en restant polarisée). Dans le dernier cas, l'orientation contre le flux est perdue du fait des forces mécaniques qui poussent les pseudopodes et les filopodes sur le côté ou au-dessus des cellules qui, parfois, dérivent alors avec le flux (voir les séquences d'images des Figures 9_4, 10_3 et 10_4). L'effet de forces de centrifugation a déjà été étudié sur des cellules *Dictyostelium* et des observations similaires ont été faites (Fukui et al., 2000). Les cellules orientées contre les forces de centrifugation peuvent voir leur pseudopode courbé sur le côté ou en volume au-dessus du corps cellulaire lorsque les forces appliquées sont suffisamment grandes pour empêcher la migration cellulaire contre ces forces (Fig. 12_1). Phases de contraction et effet des forces mécaniques sur les protrusions sont deux explications possibles de la perte temporaire de polarité ou de l'orientation cellulaire contre le flux. Après une phase de perte de polarité ou de perte d'orientation contre le flux, la majorité des cellules recouvre une polarité et se réoriente face au flux, à condition de ne pas s'être détachées du substrat (par exemple, Figure 9_4).

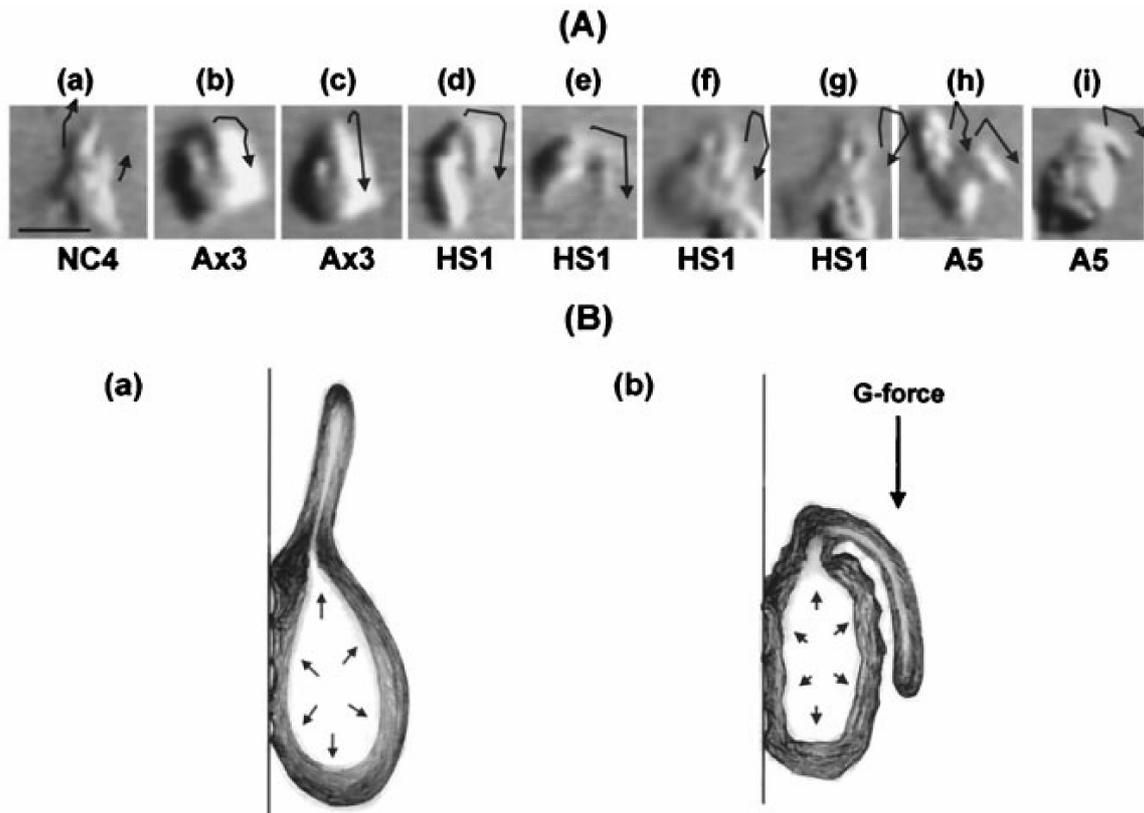


Figure 12_1: Des cellules soumises à des forces de centrifugation ne peuvent plus avancer contre ces forces. Elles voient leur pseudopode (front avant) courbé sur le côté ou en volume au-dessus du corps cellulaire (Fukui et al., 2000).

Lorsque le flux est arrêté, les cellules, précédemment orientées par l'écoulement, maintiennent leur orientation pendant plus de trois minutes et ensuite s'orientent aléatoirement (Fig. 9_2_D). Or des cellules *Dictyostelium* qui migrent aléatoirement sur un substrat produisent et rétractent des pseudopodes et changent d'orientation environ toutes les 1,5 minutes (Yumura and Fukui, 1998). Nos expériences montrent également, avec les cellules utilisées pour mon travail, que le temps maximum d'orientation dans une direction est de l'ordre de la minute et demie (valeur de 88 ± 44 sec rapportée dans la deuxième partie des *Résultats*). Ces observations mettent clairement en évidence un effet mémoire du flux sur l'orientation cellulaire.

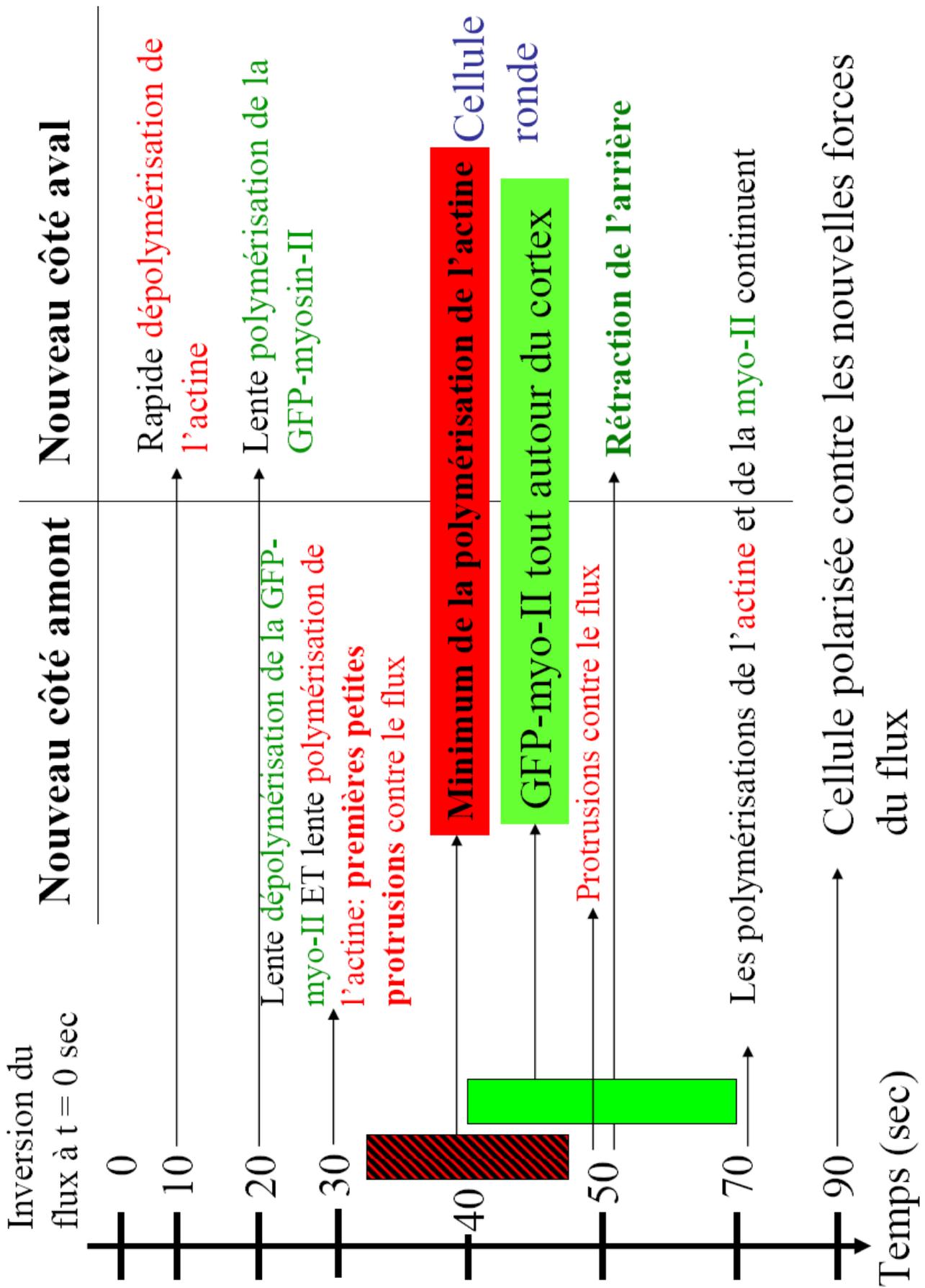
12.2.2 Réorientation après un changement de sens du flux, relocalisation de la Lim-GFP et de la GFP-myo-II

Comme nous l'avons vu dans la partie II des *Résultats*, pour obtenir les cinétiques de relocalisation, nous avons exclu les cellules qui manquaient d'adhésion et dont la

réorientation était retardée par exemple par la courbure mécanique du front avant sur les côtés ou la perte temporaire de la polarité. Dans moins de 6 % des changements de sens d'un flux de 2,1 Pa, les cellules ont d'abord gardé leur précédente orientation et leur front avant et ont commencé un virage en forme de U (U-turn) pour se réorienter. Ces cellules n'ont pas pu terminer ce virage et ont finalement engagé un processus de réorientation semblable à celui observé dans la majorité des cas. Ces cellules n'ont pas été considérées pour obtenir les cinétiques de relocalisation.

Dans les autres cas qui sont ceux qui nous intéressent, après un changement de sens du flux correspondant à une contrainte de cisaillement de 2,1 Pa, les cellules se réorientent contre le nouveau flux en environ une minute et demie en inversant leurs fronts avant et arrière de telle manière que l'actine polymérise au bord qui se retrouve face au flux (Figs 9_5 et 9_6) tandis que la myo-II s'accumule au bord nouvellement en aval de l'écoulement (Fig. 9_8). Ces deux processus de relocalisation simultanés reflètent le caractère dynamique de la réorganisation du cytosquelette. Les distributions de l'actine et de la myo-II montrent que les cellules végétatives sont donc polarisées sous flux, de manière similaire à des cellules agrégation-compétentes migrant dans un gradient chimique (comparez les distributions de ces protéines dans les Figures 9_9_A et 11_1 ; Rubino et al., 1984; Yumura et al., 1984).

Les réponses au changement de sens du flux sont très rapides avec une décroissance de l'activité protrusive du côté de l'ancien front avant qui commence en moins de 9 secondes (décroissance de la Figure 9_6). Une telle décroissance de la densité de l'actine a déjà été reportée dans le cas d'un pseudopode qui se rétracte (Yumura and Fukui, 1998). Ainsi, le changement de sens des forces mécaniques affecte le turnover de l'actine et sa redistribution dans la totalité de la cellule en quelques secondes (c'est le côté aval qui est visiblement rapidement affecté). La réorientation à 180° avec une inversion complète de la polarité cellulaire et l'échange des fronts avant et arrière est associée à un minimum de la polymérisation de l'actine environ 30-45 secondes après le changement de sens du flux (Fig. 9_6 et Fiche 12_1). On a donc un processus de dépolymérisation, associé à la morphologie arrondie de la cellule, qui précède la formation d'un nouveau front avant contre le flux. Ce processus de dépolymérisation est une réponse au changement de sens du flux étant donné qu'il n'est pas observé quand le flux est simplement stoppé (Fig. 9_2_D). Contrairement aux cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP qui sont clairement asymétriques, celles obtenues avec la GFP-myo-II sont symétriques et suggèrent que les complexes de GFP-myo-II se dissocient plus lentement du cortex cellulaire que les complexes de Lim-GFP.



Fiche 12_1: Réorientation cellulaire : inversion des fronts avant et arrière après un changement de sens du flux (contrainte entre 0,9 et 2,1 Pa).

Il est important de noter qu'environ 30-40 secondes après le changement de sens du flux, la GFP-myo-II est distribuée tout autour du cortex de manière à peu près homogène (voir le graphe polaire de la Figure 9_8_C). Ce mécanisme de recrutement de la myo-II tout autour du cortex en réponse à un stimulus mécanique rejoint de nombreuses observations expérimentales. Kuwayama et al. (1996) ont reporté le recrutement de myo-II dans le cortex cellulaire en réponse à un choc osmotique, ceci pour fortifier la cellule et lui permettre de résister au choc. D'autres travaux ont montré que le fait de recouvrir des cellules d'une couche de gel d'agar (stimulus mécanique) entraînait un fort accroissement de la concentration de myo-II au sillon de division ou à l'arrière des cellules comparativement à des cellules non recouvertes (Neujahr et al., 1997). Enfin, Pasternak et al. (1989) ont montré que la liaison à la paroi cellulaire de billes recouvertes de Concanavaleine-A (que l'on peut, en partie, assimiler à un stimulus mécanique) provoquait le durcissement du réseau d'actine grâce à la myo-II, durcissement associé au capping de récepteurs de surface ainsi réticulés. Toutes ces observations convergent vers l'idée qu'un stimulus mécanique provoque une réaction de contraction globale de la cellule dépendant de la myo-II. Cette contraction globale est ensuite suivie d'une nouvelle phase d'étalement et d'acquisition d'une nouvelle polarité.

L'utilisation des cellules myo-II-null exprimant à la fois la mRFP-Lim et la GFP-myo-II a permis de confirmer nos résultats obtenus avec les mutants n'exprimant qu'un seul marqueur fluorescent et a surtout permis de suivre simultanément dans la même cellule les activités protrusive et rétractive, comme nous le verrons plus en détails plus tard.

12.2.3 La diffusion n'est pas le facteur limitant dans la relocalisation des protéines

Une question importante est de savoir quel est le facteur limitant qui contrôle le temps nécessaire pour que l'actine se relocalise vers le côté nouvellement stimulé. Autrement dit, quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent l'établissement de la polarité cellulaire sous flux et ceux qui dirigent la réorientation cellulaire après un changement de sens du flux.

Pour répondre à cette question, il est bien sûr nécessaire de disséquer au niveau moléculaire les différentes étapes qui mènent à la polarité cellulaire sous flux, ce qui n'a pas été fait dans le cadre de ma thèse. Nous verrons néanmoins dans le paragraphe consacré à la comparaison avec le chimiotactisme que certaines hypothèses peuvent être avancées.

Pour réduire l'étendue de la question précédente, nous allons voir si la diffusion des marqueurs fluorescents d'un côté à l'autre de la cellule, à laquelle on peut naturellement penser, est ou non un facteur limitant lors de la réorientation cellulaire sous flux.

Des mesures de coefficients de diffusion apparents de protéines de fusion dans des cellules *Dictyostelium* (Potma et al., 2001; Bretschneider et al., 2002) et l'observation de trois cellules (pour 33 réorientations « classiques ») qui ont montré la formation d'un nouveau front de Lim-GFP contre le nouveau sens du flux avant la disparition de l'ancien front protrusif suggèrent que la diffusion des protéines n'est pas un facteur limitant qui pourrait expliquer le temps de latence avant que la Lim-GFP ne s'accumule du côté nouvellement stimulé.

12.2.4 La polymérisation de l'actine au nouveau front avant précède la rétraction de l'arrière durant le processus de réorientation sous flux. Un lien complexe entre l'activité de contraction et la relocalisation de la GFP-myosine-II

Afin de vérifier l'existence d'un lien temporel entre l'apparition des protrusions riches en actine et les mouvements de rétraction dépendant de la myo-II lors du processus de réorientation après un changement de sens du flux, j'ai aussi quantifié, avec la redistribution des protéines, les mouvements de rétraction du côté arrière dans les cellules exprimant à la fois la GFP-myo-II et la mRFP-Lim (Fig. 9_9). Cette quantification des mouvements du bord arrière en corrélation avec la courbe de croissance du ratio de fluorescence de la mRFP-Lim a permis de montrer, qu'en moyenne, la rétraction dépendant de la myo-II commence 51 secondes après le changement de sens du flux, c'est-à-dire 15 +/- 10 secondes après l'apparition des premières protrusions riches en actine du côté face au flux. La polymérisation de l'actine au nouveau front avant précède donc la rétraction de l'arrière durant le processus de réorientation sous flux.

Cette observation est consistante avec l'étude de Weber et al. (1995). Dans ce travail, les auteurs ont utilisé une technique permettant d'enregistrer simultanément des images en fond clair et en RICM (microscopie par réflexion à contraste interférentiel) et ont ainsi suivi les changements de morphologie cellulaire et ceux de la surface de contact cellule-substrat qui se produisent lors de la migration de cellules *Dictyostelium* agrégation-compétentes sur un substrat recouvert de BSA. Ils ont conclu que le détachement se produit avec une forte probabilité dans une direction similaire à celle dans laquelle l'attachement a eu lieu de 5 à 15

secondes plus tôt. De plus, les graphes de cross-corrélation pour les scalaires quantifiant la protrusion et la rétraction du corps cellulaire (et non plus la surface de contact) montrent une tendance claire pour les coefficients positifs à des temps positifs (Fig. 12_2), ce qui indique que la protrusion du corps cellulaire précède plus souvent que ne suit la rétraction et les probabilités les plus grandes sont obtenues pour des délais temporels entre 0 et 20 secondes, ce qui correspond assez bien aux délais temporels de 15 +/- 10 secondes obtenus par nos soins entre l'apparition des premières protrusions et la rétraction de l'arrière du corps cellulaire.

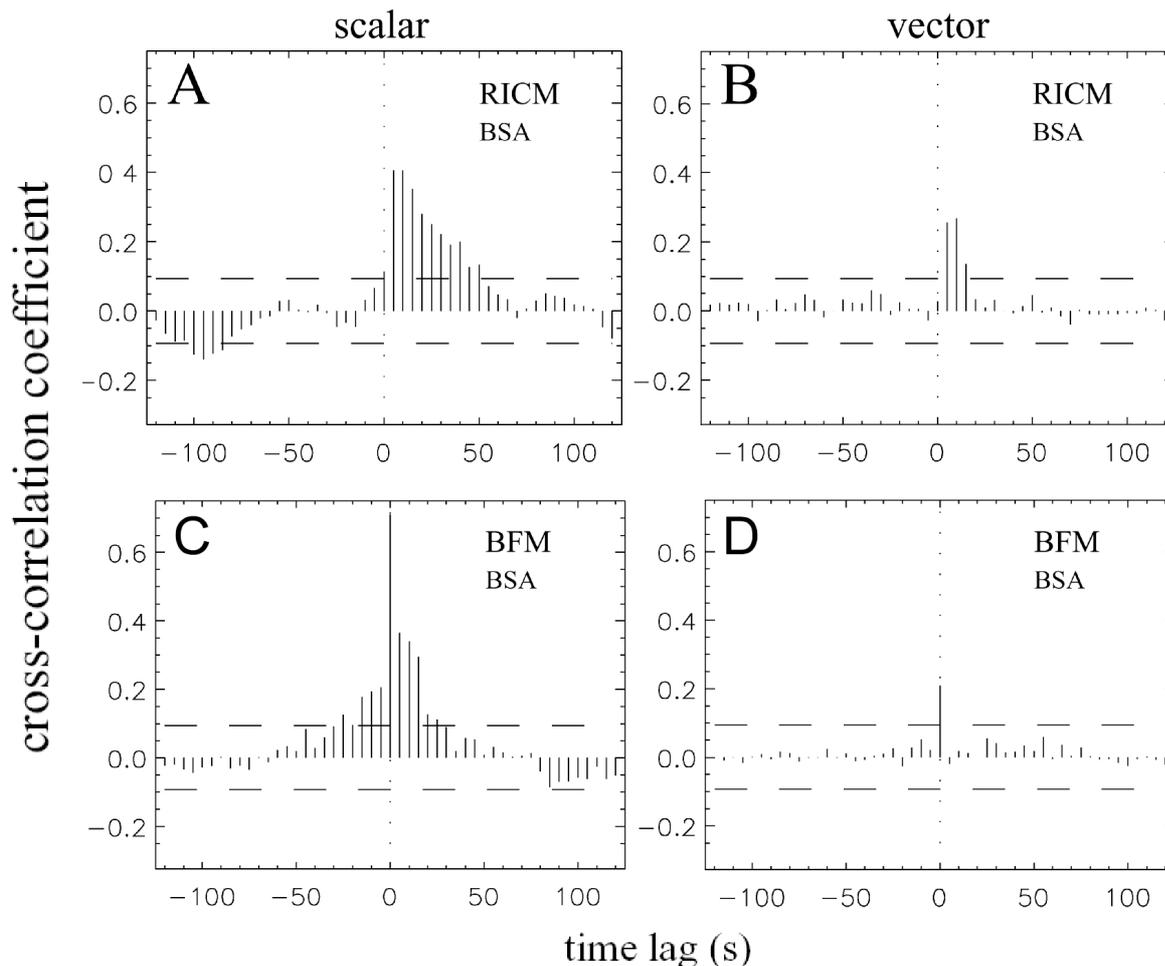


Figure 12_2: Graphes de cross-corrélation pour les scalaires (A et C) quantifiant la croissance (attachement) et la décroissance (détachement) de la surface de contact cellule-substrat (A) et la protrusion et la rétraction du corps cellulaire (C). Graphes de cross-corrélation pour les vecteurs quantifiant la direction de l'attachement/détachement (B) et des protrusions/rétractions (D). Le time lag est le temps qui s'écoule entre la protrusion et la rétraction, respectivement entre l'attachement et le détachement. Si ce time lag est positif, cela veut dire que la protrusion précède la rétraction, respectivement que l'attachement précède le détachement.

Les scalaires quantifient l'amplitude tandis que les vecteurs quantifient la direction. RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) et BFM (Bright Field Microscopy) sont les deux techniques microscopiques utilisées pour visualiser la surface de contact cellule-substrat et la forme extérieure de la cellule, respectivement (tiré de Weber et al., 1995).

Si l'on compare maintenant les courbes de relocalisation de la GFP-myo-II avec la courbe quantifiant les mouvements de rétraction, il apparaît clairement que la rétraction de l'arrière débute alors que les courbes de relocalisation de la GFP-myo-II se croisent avec des

ratios normalisés de fluorescence de la GFP-myo-II correspondant à 50 % de la croissance et de la décroissance respectivement (Fig. 9_9_C). Cela signifie donc que, lors de la réorientation cellulaire, concernant la GFP-myo-II du côté nouvellement aval, la première étape est la croissance de la densité de la protéine, puis au milieu de cette croissance, la rétraction débute et enfin, simultanément à la poursuite de la rétraction, la GFP-myo-II continue de s'accumuler de ce côté pour atteindre un maximum de fluorescence correspondant à la présence d'un arc fluorescent brillant en forme de croissant. On a donc une première accumulation de GFP-myo-II qui n'est pas corrélée à de la rétraction lors des 50 premières secondes suivant le changement de sens du flux. Cette observation implique que la localisation à l'arrière de la cellule de GFP-myo-II n'est pas nécessairement directement associée à un processus de rétraction. Deux hypothèses peuvent alors être avancées :

- soit la quantité de GFP-myo-II doit dépasser un seuil minimum pour que la contraction soit suffisante et permette le détachement du substrat et ensuite la rétraction
- soit la localisation au bord arrière de la GFP-myo-II est régulée différemment de l'activation de cette protéine qui se produit plus tard pour engendrer la contraction.

La deuxième hypothèse est consistante avec la suggestion selon laquelle la myo-II peut avoir une activité de protéine de réticulation sans activité ATPasique (Laevsky and Knecht, 2003). Ceci expliquerait que la myo-II se distribue au niveau du cortex pour réticuler le cytosquelette d'actine sans que cette redistribution ne soit nécessairement immédiatement associée à de la rétraction.

12.3 Mécanosensibilité

12.3.1 Etude de la relocalisation en fonction des forces appliquées et mécanosensibilité

Verkhovsky et al. (1999) ont montré que des fragments de kératocytes préalablement stationnaires migraient dans la direction des forces produites par un flux transitoire créé par l'expulsion d'un fluide hors d'une micropipette. Dans ces fragments, l'asymétrie initiale du système actine-myosine-II, qui a été induite par les forces du flux, est renforcée grâce à une boucle de rétroaction positive. Ces résultats mettent en évidence que l'induction de l'asymétrie par un stimulus mécanique transitoire est suffisante pour produire une polarité persistante et initier une motilité directionnelle, ceci sans nécessiter l'existence d'un mécanisme mécanosensible. Cette observation est consistante avec un mécanisme d'auto-

propagation de la polarité. Il est intéressant de comparer ces expériences avec celles réalisées lors de ma thèse. Dans mes expériences actuelles, les cellules *Dictyostelium discoideum* s'orientent contre les forces du flux, de telle manière que ces forces, qui poussent mécaniquement le front avant, ont tendance à le détacher du substrat et gênent son adhésion et donc la motilité cellulaire. Ainsi, les cellules qui protrudent contre le flux ne maintiennent pas une forme asymétrique que les forces de cisaillement auraient initialement induite, et qui s'auto-propagerait, comme dans le cas des fragments de kératocytes, et serait ainsi responsable du maintien de la polarité cellulaire. Ces considérations excluent l'hypothèse selon laquelle, dans mes expériences sous flux, les forces de cisaillement seraient responsables de la polarité cellulaire seulement en induisant initialement une asymétrie, par exemple, du système actine-myosine-II. Ainsi, l'orientation des amibes contre les forces de l'écoulement supporte l'idée que cet organisme unicellulaire est mécanosensible et que les forces du flux activent une ou des voie(s) de signalisation spécifique(s) grâce à un ou plusieurs mécanismes mécanosensibles. Cette activation mène à la polarisation cellulaire avec, du côté face au flux, polymérisation de l'actine et, du côté aval, la contraction dépendante de la myo-II.

De plus, l'observation selon laquelle les cellules sont polarisées par un flux de 2,1 Pa indépendamment de la densité cellulaire sur le substrat et restent polarisées à de très faibles densités cellulaires exclut la possibilité que les cellules *Dictyostelium* réagissent à et s'orientent en fonction de chimioattractants qui seraient secrétés par d'autres cellules et dispersés par le flux.

D'autre part, qui dit « mécanosensible », dit « capable de mesurer des forces ». Nous avons ainsi réalisé les mêmes expériences de réorientation sous flux avec une contrainte de cisaillement de 0,9 Pa, de manière à étudier la dépendance du ou des mécanisme(s) mécanosensible(s) de *Dictyostelium* en fonction des forces appliquées.

Il a été observé que le ratio de fluorescence de la Lim-GFP décroît de façon similaire du côté nouvellement arrière pour les deux taux de cisaillement. Cependant, à 0,9 Pa, la polymérisation de l'actine du côté stimulé commence plus tôt, seulement 15 secondes après le changement de sens, comparé à 36 secondes sous 2,1 Pa (Fig. 9_7) et est légèrement plus rapide à 0,9 Pa qu'à 2,1 Pa. Les cinétiques de réorganisation du cytosquelette suivant un changement de sens du flux dépendent donc du taux de cisaillement.

Ce résultat met l'accent sur le fait que l'amibe peut mesurer les forces mécaniques et qu'elle répond à la fois à leur direction et à leur intensité. On peut d'autre part remarquer que le fait de changer le taux de cisaillement n'a eu d'effet visible que sur la polymérisation de

l'actine du côté stimulé par le flux. Cela suggère que ce côté joue un rôle important dans la réponse mécanosensible.

L'ensemble de ces résultats et considérations confirment donc bien l'existence d'un mécanisme mécanosensible dans cet organisme eucaryote.

12.3.2 Comment expliquer la relocalisation plus rapide de Lim-GFP sous un taux de cisaillement plus faible ?

Le flux a deux effets contradictoires sur les cellules qui sont, (i) d'activer la polymérisation de l'actine du côté stimulé de la cellule, c'est-à-dire de déclencher l'apparition de protrusions, et (ii) d'exercer des forces contre ce côté exposé qui empêchent son adhésion au substrat. Le résultat de la partie précédente suggère donc que l'équilibre entre ces deux effets dépend du taux de cisaillement. Sous un cisaillement de 0,9 Pa, les mécanosenseurs semblent toujours activés de manière efficace étant donné que la polymérisation de l'actine a toujours lieu et les nouvelles protrusions contre le flux qui en résultent peuvent adhérer plus facilement au substrat car les forces du flux sont plus faibles. Ainsi, elles se développent plus rapidement, ce qui provoque une polarisation cellulaire plus rapide à 0,9 Pa.

Une autre hypothèse pour expliquer pourquoi la Lim-GFP se relocalise plus tôt et plus rapidement au côté exposé sous un plus petit taux de cisaillement concerne la tension membranaire. Les forces produites par l'écoulement d'un fluide augmentent la tension membranaire du côté stimulé et ce proportionnellement au taux de cisaillement (Simson et al., 1998). De plus, d'autres travaux ont prouvé que la croissance des lamellipodes et filopodes était contrôlée par la tension membranaire (Karl and Bereiter-Hahn, 1999; Raucher and Sheetz, 2000). La vitesse de croissance des protrusions varie de manière inversement proportionnelle avec la tension membranaire (Fig. 12_3).

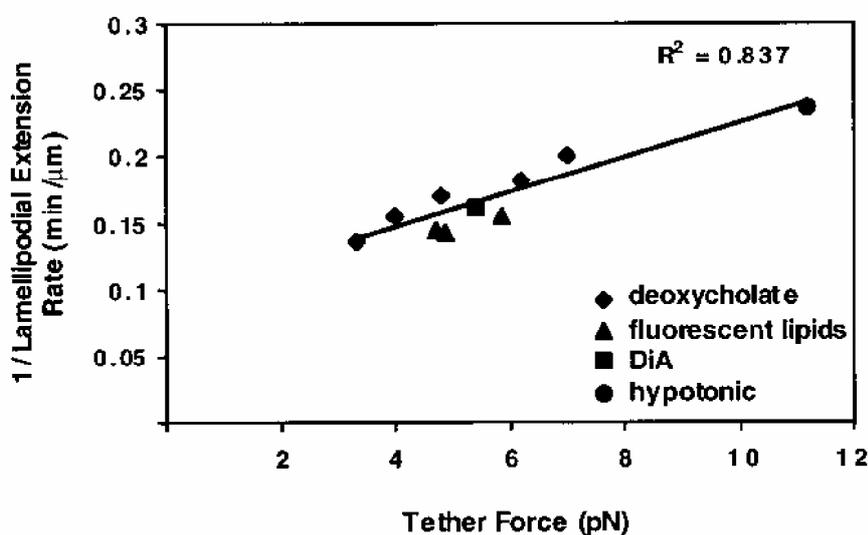


Figure 12_3: Le taux d'extension des lamellipodes croît avec l'inverse de la tension membranaire. La tension membranaire est estimée en mesurant, à l'aide de pinces optiques, la force d'attachement (tether force) de billes de latex liées à la membrane plasmique. Les molécules amphiphiles sont ajoutées pour provoquer la décroissance de la tension membranaire (tiré de Raucher and Sheetz, 2000).

Ainsi, sous un taux de cisaillement de 0,9 Pa, l'augmentation de la tension membranaire du côté exposé au flux est plus petite que sous 2,1 Pa. Dans le cas où les forces du flux activent toujours la polymérisation de l'actine, ce qui est clairement le cas à 0,9 Pa, alors cette croissance plus faible de la tension membranaire favorise l'activité protrusive. Ainsi, la tension membranaire jouerait un rôle pour sentir le taux de cisaillement et influencerait la relocalisation de l'actine après un changement de sens du flux, suggérant que la membrane plasmique agit comme un mécanosenseur. Dans ce sens, des études ont démontré qu'une bicouche phospholipidique ou la membrane plasmique d'une cellule sont capables d'agir comme des mécanorécepteurs (Gudi et al., 1998; Haidekker et al., 2000; Mallipattu et al., 2002; Chemin et al., 2005). Il a aussi été montré que la phospholipase A2 agit comme un mécanorécepteur dans un mécanisme dépendant de la densité de l'arrangement lipidique (Lehtonen and Kinnunen, 1995).

12.3.3 Mécano-récepteurs

Les mécanorécepteurs amont des forces mécaniques restent inconnus dans la plupart des types cellulaires et les mécanismes moléculaires de la mécanotransduction sont peu compris. A ma connaissance, aucune étude n'a identifié de mécanorécepteur chez *Dictyostelium discoideum*.

D'un côté, les structures du cytosquelette fournissent un bouclier, une coque pour résister aux forces exercées par l'environnement extérieur ou exercées par la cellule elle-même (Ingber, 1993; Kuwayama et al., 1996). D'un autre côté, ces structures permettent de sentir les stimuli mécaniques dans différents types cellulaires (Wang et al., 1993; Ingber, 1997; Riveline et al., 2001; Helmke and Davies, 2002; Alenghat et al., 2004). Dans certaines études, des cytosquelettes insolubles dans des détergents ont été utilisés et l'association et la dissociation de protéines spécifiques aux points focaux ont été observées en réponse à un stimulus mécanique et ce indépendamment d'éventuels courants ioniques étant donné que ces cytosquelettes ne sont plus entourés d'une membrane plasmique (Sawada and Sheetz, 2002). Ces études mettent donc l'accent sur le rôle du cytosquelette dans la mécanosensibilité de certains types cellulaires, indépendamment de la présence de canaux ioniques.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis attaché à déterminer le possible rôle des structures du cytosquelette dans la détection et la mesure de forces mécaniques de cisaillement par *Dictyostelium*. Comme nous l'avons vu dans l'*Introduction*, le cytosquelette

des cellules *D. discoideum* est composé de deux structures : le réseau de microtubules et le réseau d'actine.

12.3.3.1 Le rôle des microtubules dans la sensibilité aux forces mécaniques

Dans le modèle de « tensegrity », les microtubules supportent les charges mécaniques qui sont transmises sur de longues distances à l'intérieur du cytoplasme et jusqu'aux intégrines (Ingber, 1997). Elbaum et al. (1999) ont suggéré que les microtubules jouaient un rôle dans le contrôle des forces produites par la cellule au niveau des sites d'adhésion. Dans des cellules endothéliales humaines, l'activation de la Src induite par un flux n'a plus lieu lorsque les microtubules sont détruits (Wang et al., 2005). La destruction du réseau de microtubules dans des cellules épithéliales de rein élimine aussi la croissance de la concentration de calcium intracellulaire normalement provoquée par un flux de liquide (Alenghat et al., 2004). Toutes ces données montrent que les microtubules jouent un rôle important dans la mécanosensibilité et la transmission de forces sur de longues distances dans de nombreux types cellulaires.

Pour tester le rôle des microtubules dans la sensibilité aux forces exercées par un flux de liquide chez *Dictyostelium*, j'ai utilisé du nocodazole, une drogue couramment utilisée pour détruire le réseau de microtubules (de Priester et al., 1988), mon but étant de répéter les mêmes expériences sous flux avec des cellules dépourvues de ce réseau. Pour des raisons pratiques, j'ai effectué ces expériences avec la souche HS1 de cellules myo-II-null, mais malheureusement, alors que l'effet du nocodazole est clair sur la souche sauvage JH10, il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet suffisant du nocodazole sur la souche mutante et les cellules myo-II-null (HS1) traitées au nocodazole (concentrations utilisées entre 5 et 40 μ M) possèdent toujours un réseau de microtubules (vérification avec des cellules exprimant la GFP- α -tubuline ou par immunofluorescence). Il semble donc que l'effet de cette drogue ne soit pas toujours maximal sur certaines souches cellulaires. Cette étude est donc toujours en cours.

12.3.3.2 La myosine-II ne joue pas de rôle dans la mécanosensibilité

Il a été montré que le cytosquelette d'actine jouait un rôle dans la sensibilité aux forces mécaniques et ceci dans des conditions expérimentales variées (Glogauer et al., 1997;

Riveline et al., 2001; Wang et al., 2005). Chez *Dictyostelium*, la myosine-II joue un rôle central dans l'intégrité du cortex (Pasternak et al., 1989) à travers son activité de réticulation du réseau d'actine (Laevsky and Knecht, 2003). Il a été montré que la relocalisation de la myo-II au niveau du cortex était nécessaire pour supporter un choc osmotique et il a été suggéré que cette redistribution fournissait une fortification physique rendant la cellule capable de résister à une contraction importante (Kuwayama et al., 1996).

N'ayant pas pu vérifier le rôle du cytosquelette d'actine dans sa globalité dans le processus de réorientation après un changement de sens du flux (trop de détachement des cellules quand elles sont traitées à la latrunculine-A qui dépolymérise le réseau d'actine), j'ai cherché à découper cette étude en m'intéressant au rôle de la myosine-II qui est l'une des protéines les plus abondantes du cytosquelette d'actine.

J'ai donc réalisé des expériences d'inversion du sens du flux avec un mutant myo-II-null (Ruppel et al., 1994). Ces cellules dépourvues de myo-II sont encore viables, capables de projeter des pseudopodes et de migrer bien que moins rapidement (Wessels et al., 1988). Dans nos expériences sous flux, les cellules myo-II-null montrent la même réponse à un changement de sens du flux que les cellules sauvages, dans la mesure où elles se réorientent contre le nouveau flux en inversant leurs fronts avant et arrière (Fig. 10_2_A). De plus, les cinétiques de relocalisation de la Lim-GFP dans la souche myo-II-null sont similaires à celles dans la souche parentale sauvage (Fig. 10_2_B). Ces résultats mettent en évidence que la myo-II n'est nécessaire ni pour sentir les forces mécaniques de l'écoulement, ni pour relocaliser efficacement l'actine après un changement de sens du flux. Ainsi, les cellules *D. discoideum* peuvent répondre à des forces hydrodynamiques en utilisant un mécanisme indépendant de la myo-II.

Les cellules myo-II-null maintiennent même une orientation stable contre le flux pendant de plus longues périodes que les cellules de la souche parentale (voir *Résultats*). Cette orientation plus stable contre le flux des myo-II-null peut probablement s'expliquer par une meilleure adhérence au substrat comparée à celle des cellules JH10. Cette meilleure adhérence est suggérée par des taux de détachement sous flux supérieurs pour les cellules sauvages (40 +/- 25 % en 10 minutes sous 2,1 à 2,3 Pa) que pour les myo-II-null (17 +/- 12 % dans les mêmes conditions). Cette plus grande adhérence des cellules myo-II-null est consistante avec les travaux de Uchida and Yumura (2004) qui ont montré que les cellules myo-II-null possèdent plus de foyers d'actine (actin foci ; moyenne de 19,7 +/- 11,2 foyers par cellule myo-II-null) que les cellules sauvages (moyenne de 6,7 +/- 3,9) et que ces « actin foci » sont des zones d'adhésion au substrat. Ces observations soulignent l'importance de l'adhésion

dans les expériences sous flux et la mécanosensibilité (Bruckert et al., 2002; Geiger and Bershadsky, 2002; Li et al., 2005).

De plus, les cellules myo-II-null sont plus allongées dans la direction du flux que les cellules JH10 (voir *Résultats* et la Figure 10_6 pour un exemple de comparaison). Cet allongement plus important sous flux comparé à la souche parentale peut être expliqué par un effet mécanique des forces du flux sur le cortex moins rigide des myo-II-null (Pasternak et al., 1989; Laevsky and Knecht, 2003) et/ou par une rétraction moins efficace de l'arrière. L'effet accru de forces sur des cellules myo-II-null a déjà été observé dans les expériences de centrifugation de Fukui et al. (2000) qui observent une courbure du pseudopode avant de ces cellules pour des forces moins importantes qu'avec des cellules sauvages. Laevsky and Knecht (2003) ont aussi rapporté des morphologies très déformées et allongées de ces cellules sous une couche de gel (Fig. 12_4).

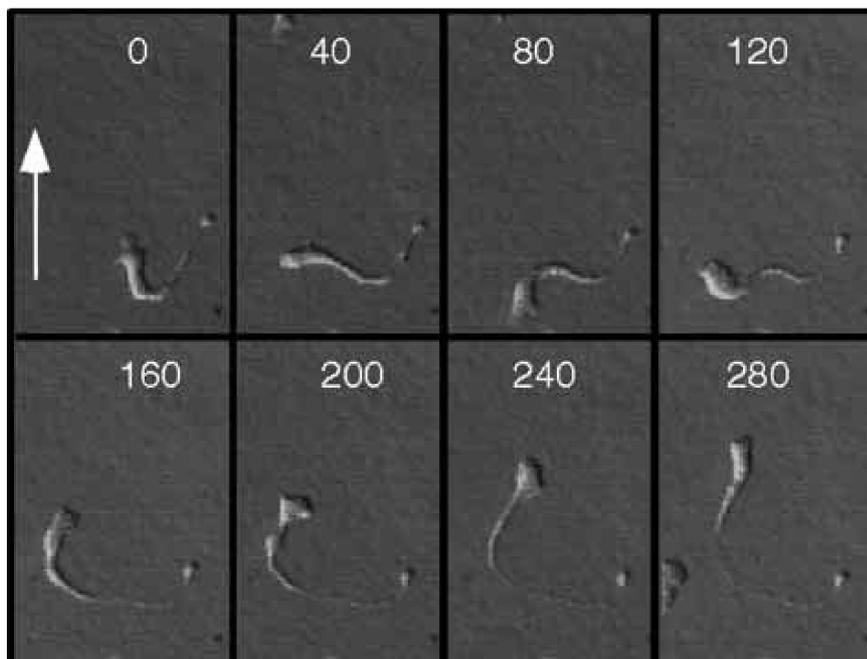


Figure 12_4: Une cellule myo-II-null migre sous une couche d'agarose (0,5 %). La cellule se fragmente et va perdre son extrémité arrière. Les chiffres indiquent le temps en secondes (tiré de Laevsky and Knecht, 2003).

Il est important de noter que le fait que la relocalisation de l'actine sous flux soit aussi rapide dans les cellules myo-II-null que dans les cellules sauvages suggère que la rigidité du cortex n'est pas un paramètre clé pour sentir les forces du flux chez *Dictyostelium*.

Dans les fibroblastes, la formation de points focaux induite par des forces mécaniques ne nécessite pas de contraction cellulaire médiée par l'association actine-myosine. Cela a été démontré par l'observation de complexes focaux et de points focaux qui répondent à un stimulus mécanique extérieur et se comportent en capteurs mécanosensibles miniatures même

en présence d'un inhibiteur puissant de l'activité ATPasique de la myosine-II (Riveline et al., 2001). Au contraire, Alenghat et al. (2004) ont montré que l'inhibition de l'activité contractile du complexe actine-myosine élimine la réponse calcique induite par un flux dans des cellules épithéliales de rein. Ils suggèrent que les réponses à des stimuli mécaniques sont contrôlées par un équilibre global des forces à travers la structure entière de la cellule et pas seulement par un mécanisme d'activation locale au niveau de la membrane cellulaire. Ces différences (besoin ou non de la myosine-II pour sentir les forces mécaniques selon le type cellulaire) soulignent la diversité des mécanismes mécanosensibles présents dans différents types cellulaires.

12.3.3.3 Rôle du front avant contre le flux en tant que zone d'adhésion au substrat

Nous avons vu dans la partie « *Résultats* » que la base du pseudopode riche en actine filamenteuse et faisant face au flux était en contact rapproché et très probablement en adhésion avec le substrat. De nombreux travaux soutiennent que l'adhérence au substrat joue un rôle important dans la sensibilité à des forces mécaniques extérieures (Balaban et al., 2001 ; Riveline et al., 2001 ; Alenghat et al., 2004).

Le fait que la rigidité du cortex ne semble pas jouer de rôle dans la mécanosensibilité de *D. discoideum* suggère que l'activation de voies de signalisation par les forces d'un écoulement se produit localement et que le côté exposé au flux joue un rôle important pour sentir et transmettre les forces mécaniques.

Lorsqu'une cellule migre, les protrusions émises doivent adhérer au substrat pour permettre à la cellule de déplacer sa surface de contact avec le substrat dans le sens de la migration. Le fait que la base du pseudopode riche en actine filamenteuse semble être une zone d'adhésion au substrat supporte l'idée que l'ancrage de la base des pseudopodes au substrat se fait grâce à l'interaction directe des protéines d'adhésion avec le cytosquelette d'actine.

D'autre part, pour rétracter, les cellules *Dictyostelium* ont besoin d'un ancrage au substrat à l'avant de la cellule (Fig. 12_5). Cet ancrage pourrait en partie être fourni par le site d'adhésion à la base du nouveau front avant contre le flux. Cette hypothèse est consistante avec le fait que la formation du front avant riche en actine filamenteuse précède la rétraction de l'arrière. Il est possible que la base du front avant contre le flux soit riche en foyers d'actine.

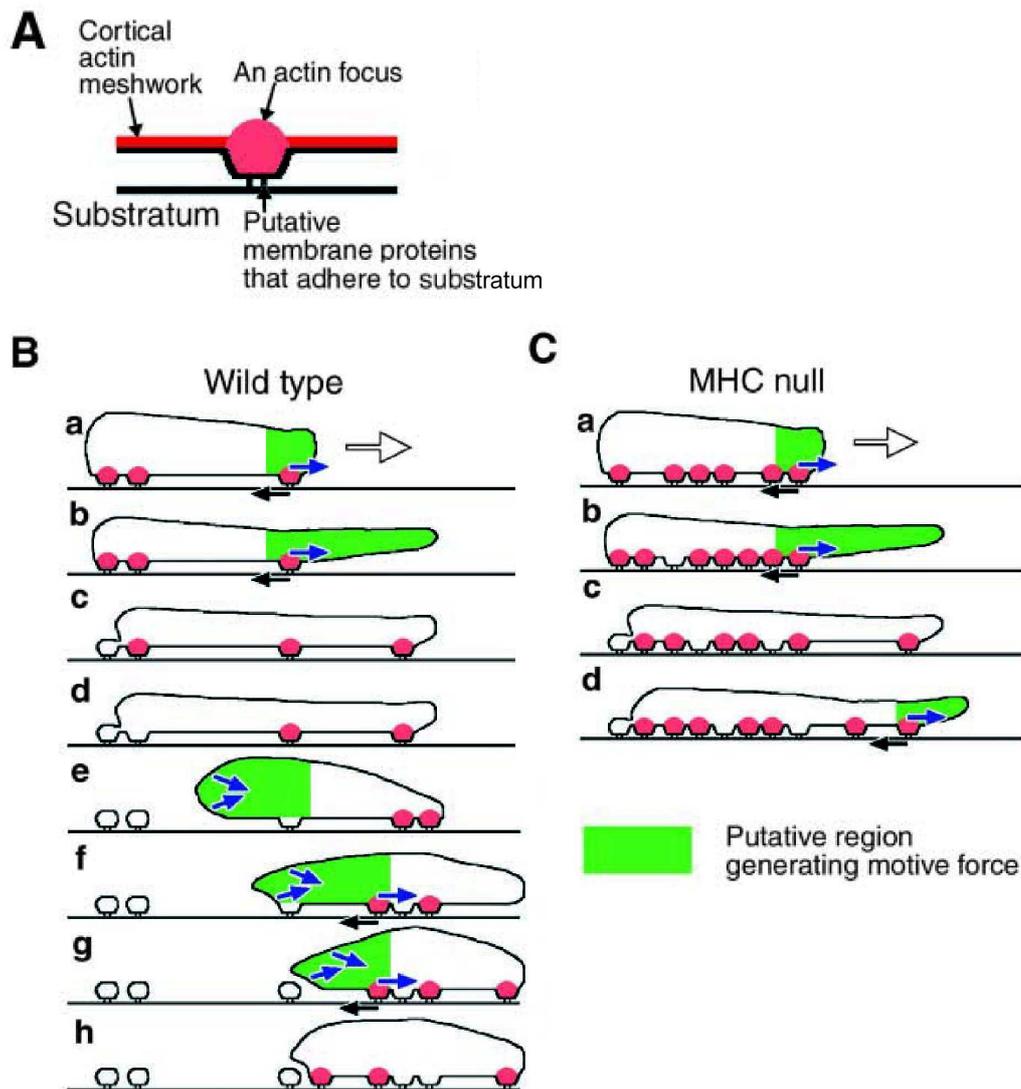


Figure 12_5: Pour rétracter, les cellules *Dictyostelium* ont besoin d'un ancrage au substrat à l'avant de la cellule et d'une libération des contacts adhésifs à l'arrière lors de la rétraction (B). Des sites d'ancrage au substrat proposés par Uchida and Yumura (2004) sont les foyers d'actine (A) et pourraient être régulés par la myosine-II (C) (tiré de Uchida and Yumura, 2004).

12.4 Réorientation sous flux versus réorientation en réponse à un stimulus chimique

Dictyostelium a largement été utilisé pour disséquer les voies de signalisation qui mènent à la polarité et à l'orientation cellulaires dans le cas du chimiotactisme (pour des revues, voir Chung et al., 2001; Comer and Parent, 2002). Il a été montré que l'activation de la PI3K au front avant augmentait la production de PI(3,4)P₂ et de PI(3,4,5)P₃, ce qui provoque le recrutement de protéines contenant des domaines PH (pour «Pleckstrin Homology»), comme les protéines CRAC, PhdA, Akt/PKB. Cela résulte en l'activation

localisée d'effecteurs et entraîne la polymérisation de l'actine. A l'arrière, PAKa inhibe la kinase A de la chaîne lourde de la myo-II (myosin heavy chain kinase A, MHCKA), ce qui promeut l'assemblage de la myo-II. Il a été montré qu'une cascade de signalisation faisant intervenir le cGMP jouait un rôle majeur dans la régulation de la myo-II à travers l'activation de la GbpC, une protéine contenant des domaines homologues à Ras et à Ras-GEF (Bosgraaf et al, 2002). PTEN, une protéine qui détruit les produits de la PI3K, a une localisation réciproque de celle de la PI3K et leur exclusion spatiale réciproque pourrait amplifier les signaux émanant des récepteurs couplés aux protéines G grâce à une boucle de rétroaction positive. Un modèle de réorientation cellulaire quand la direction du gradient chimique est changée a été proposé dans plusieurs revues (Firtel and Chung, 2000; Chung et al., 2001). Les auteurs ont proposé que, quand la direction du gradient chimique est changée en déplaçant la micropipette remplie d'AMPc près d'un bord de la cellule (pour produire un signal directionnel fort), il y a une décroissance rapide de la concentration localisée de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ à l'ancien front avant. Cette diminution est visualisée par une diminution de la localisation des protéines contenant des domaines PH et est associée à la disparition de protrusions à l'ancien front avant. La dissociation de l'actine filamenteuse de l'ancien front avant et de la myo-II de l'ancien front arrière est plus lente. La formation d'une nouvelle région riche en domaines PH se situe au niveau de la portion membranaire la plus proche du bout de la pipette. Comer and Parent (2002) ont reporté que l'association des protéines contenant des domaines PH à la membrane plasmique prenait environ 30 secondes pour les cellules sauvages (ce qui correspond au temps de latence avant la croissance du ratio de fluorescence de Lim-GFP sous un flux de 2,1 Pa). Ainsi, dans l'étape suivante, un nouveau front avant contenant de l'actine filamenteuse se développe à l'endroit de la localisation des protéines riches en domaines PH et un nouveau postérieur enrichi en myo-II se forme par la suite.

Des travaux rapportent l'observation de réorientations dans un gradient chimique. Dans le travail de Ueda et al. (1997), une micropipette remplie de chimioattractant était rapidement déplacée à l'arrière de cellules *Dictyostelium* en migration pour les forcer à changer leur direction de mouvement. La cellule montrée en Figure 3 de ce papier (Fig. 12_6) montre une inversion des côtés arrière et avant similaire à celle que nous avons observée sous flux et cela a nécessité entre 20 et 25 secondes pour qu'elle protrude dans la nouvelle direction du mouvement, c'est-à-dire vers l'extrémité de la pipette. Cette période de latence est similaire à celle observée de 15-35 secondes (selon le taux de cisaillement) lors de la réorientation dans les expériences sous flux (Figs 9_6 et 9_7).

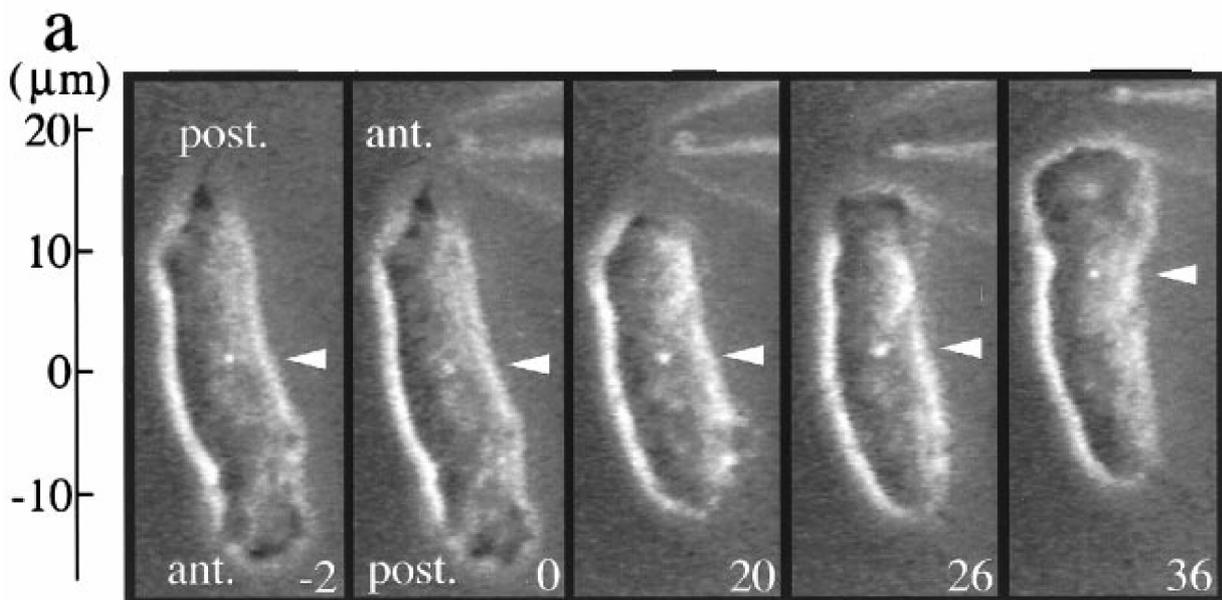


Figure 12_6: Une cellule *Dictyostelium* est forcée de se réorienter du fait du déplacement de la pipette au niveau de son bord arrière. D'abord, les protrusions cellulaires au nouveau bord aval disparaissent. A 20 sec, la cellule est moins allongée (arrondissement) et très peu protrusive. Puis, à 26 sec, elle refait une protrusion dans la nouvelle direction vers le bout de la pipette. Elle a complètement inversé sa polarité (Ueda et al., 1997). Temps indiqué en sec. Le pointeur et le point rond blancs indiquent la position du centrosome.

Dans d'autres expériences où la micropipette a été placée près de l'arrière de cellules migrant dans un gradient chimique, des granulocytes se sont réorientés soit en faisant un virage en forme de U (U-turn), soit, et souvent, en inversant leur polarité avec un changement de direction de migration de 180° (Gerisch and Keller, 1981). La formation d'un nouveau front était habituellement précédée par l'inactivation du précédent, comme observé sous flux lors de mon travail. Toujours dans des expériences de chimiotactisme, Insall et al. (2001) ont aussi reporté un processus de réorientation cellulaire avec perte temporaire de la polarité et l'ancien front avant qui finalement devient le front rétractant. Gerisch et al. (1995) ont aussi observé le même processus avec des cellules marquées par la GFP-coronine (Fig. 12_7).

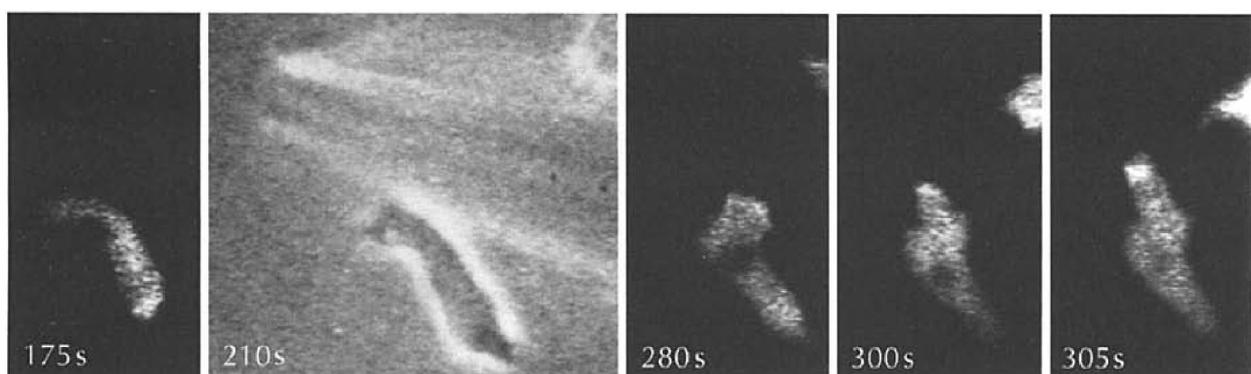


Figure 12_7: La cellule (marquée à la GFP-coronine) est initialement motile vers le coin en bas à droite où se trouve la pipette qui est déplacée à 205 sec vers le haut (image à 210 sec). La cellule inverse sa polarité et se dirige à nouveau vers le bout de la pipette en accumulant de la GFP-coronine au nouveau front avant (Gerisch et al., 1995).

Ces observations qualitatives faites dans le cadre du chimiotactisme étant similaires à nos observations lors de l'inversion du sens d'un flux, il est donc tentant de spéculer que la réorientation cellulaire sous flux est gouvernée par les mêmes mécanismes moléculaires. Les cinétiques de relocalisation sous flux observées pour l'actine et éventuellement pour la myo-II pourraient donc, de façon similaire, être dirigées par la disparition et l'apparition de sites de liaison (par exemple, présence de lipides membranaires, de protéines contenant des domaines PH), respectivement à l'ancien et au nouveau bord avant. Sous flux, des voies de signalisation pourraient être activées par des courants ioniques à travers l'ouverture de canaux ioniques mécaniquement activés. De tels canaux, contrôlés par la tension membranaire, ont récemment reçu beaucoup d'attention (pour des revues, voir Kung, 2005; Anishkin and Kung, 2005).

Pour pouvoir comparer plus quantitativement les expériences sous flux et celles dans un gradient chimique, j'ai aussi réalisé des expériences de réorientation en déplaçant une micropipette remplie d'AMPc de manière à forcer les cellules à inverser leur direction de migration. Ces expériences ont été réalisées avec les cellules doublement marquées utilisées sous flux (HS1 exprimant la mRFP-Lim et la GFP-myo-II). Mes observations dans un gradient chimique sont en accord qualitatif avec tous les résultats d'expériences de chimiotactisme mentionnées juste au-dessus. Les deux comportements (U-turn ou inversion de la direction de migration) ont aussi été observés quand la pipette était déplacée à l'arrière de cellules en migration. Après un changement de sens du flux avec des contraintes de cisaillement supérieures à 0,9 Pa, la réorientation cellulaire a lieu avec complète inversion des côtés avant et arrière. Soumises à des taux plus faibles (contraintes inférieures à 0,5 Pa), les cellules pouvaient terminer des virages en U-turn. Dans le cas du chimiotactisme, ce qui détermine le mode de réorientation entre un U-turn et l'inversion complète de la polarité cellulaire n'est pas encore clair. Il a été rapporté que plus faible est la stimulation, plus grande est la probabilité de voir une cellule tourner plutôt que renouveler sa polarité en formant de nouveaux fronts avant et arrière (Firtel and Chung, 2000). La même tendance semble être vraie sous flux. Pour répondre à ce genre de question dans le cas du chimiotactisme, des chambres avec des gradients chimiques mieux définis (Rhoads et al., 2005) seront nécessaires pour identifier les caractéristiques des stimuli chimiques menant à l'un ou l'autre de ces modes de réorientation.

D'un point de vue qualitatif, la réorientation dans un gradient chimique (Quatrième partie des *Résultats*) et celle sous flux sont similaires. Les étapes caractéristiques de ces réorientations, après déplacement de la pipette à l'arrière de la cellule ou inversion du sens du flux, sont les suivantes :

- une rapide disparition des protrusions du côté ancien front avant
- une phase dans laquelle la polymérisation de l'actine est à son minimum (solation)
- à peu près au même moment, la myosine-II est répartie tout autour de la cellule
- puis, de nouvelles protrusions apparaissent au nouveau front avant, et la myo-II finit par s'accumuler au nouveau front arrière (Fiche 12_1).

Ces observations prouvent donc que le mode de réorientation cellulaire avec complète inversion des côtés avant et arrière n'est pas spécifique des expériences sous flux. Ceci met l'accent sur le caractère universel de ce mode de réorientation cellulaire sous une stimulation importante, qu'elle soit mécanique ou chimique.

Il est important de noter qu'avec les deux types de stimuli, la réponse la plus rapide à l'inversion du sens du flux ou à l'inversion du gradient chimique est la réponse négative (et à priori globale) menant à la dépolymérisation de l'actine en particulier du côté du nouveau bord aval. L'activation locale de voie(s) de signalisation menant à la polymérisation de l'actine au nouveau front avant est plus lente. Ce mécanisme d'inhibition rapide et d'activation lente n'est pas pris en compte dans le modèle LEGI (Local Excitation / Global Inhibition) du groupe de Devreotes qui est généralement accepté pour expliquer la motilité chimiotactique (Janetopoulos et al., 2004). Ce modèle met en avant une activation locale et rapide et une inhibition globale et lente. Au contraire, nos observations nous conduisent à proposer un modèle de solation rapide (complète dépolymérisation du réseau d'actine) et de gélification lente (activation menant à la fabrication de nouvelles protrusions) pour expliquer le mode de réorientation cellulaire à 180° avec complète inversion des deux côtés cellulaires.

Pour pouvoir comparer plus quantitativement les expériences sous flux et celles dans un gradient chimique, j'ai quantitativement analysé, au moyen des mêmes outils d'analyse d'images, les films enregistrés montrant des cellules agrégation-compétentes se réorientant en inversant leur polarité après le déplacement d'une pipette remplie d'AMPC. Ces résultats sont exposés dans la quatrième partie de *Résultats*. Malgré la ressemblance des observations qualitatives sous flux et dans un gradient chimique, il semble que les cinétiques de relocalisation de la mRFP-Lim sont plus rapides dans la réponse chimiotactique : en particulier, la décroissance du ratio de fluorescence de la mRFP-Lim a lieu en 10 secondes, ce qui est plus rapide que les décroissances équivalentes suivant l'inversion d'un flux (Fig. 11_4). Sinon, la relocalisation de protéines est très semblable dans les deux types

d'expériences, ce qui montre encore le caractère universel du mode de réorientation cellulaire avec complète inversion des fronts avant et arrière.

12.5 Conclusion, perspectives

En résumé, mes travaux confirment l'existence de mécanismes mécanosensibles chez *Dictyostelium*. Un écoulement de cisaillement active une ou des voie(s) de signalisation et polarise ces cellules, qui s'orientent et protrudent contre les forces mécaniques produites par le flux. Après un changement de sens du flux, l'amibe réagit en moins de 10 secondes et se réoriente contre le nouveau flux en environ une minute et demie en inversant sa polarité : l'ancien front avant devient le nouveau front arrière et vice versa. La première réaction des cellules à l'inversion du sens du flux est la perte de l'activité protrusive avec un processus de globale dépolymérisation des filaments d'actine suivie d'une légère globale contraction avec redistribution de la myo-II tout autour du cortex cellulaire. Après la solation rapide du cytosquelette, l'actine se redistribue et repolymérise du côté du nouveau front avant. Ce modèle en deux étapes (solation-gélation) de la réorganisation du cytosquelette en réponse à l'activation par un stimulus externe semble communément observé dans diverses situations (Janmey, 1994; Yap and Kamm, 2005). Quand la cellule termine sa réorientation, les protrusions riches en actine apparaissent d'abord contre le nouveau flux et ensuite, environ 15 secondes plus tard, se produit la rétraction efficace dépendant de la myo-II. De plus, la contractilité due au complexe actine-myosine n'est pas nécessaire chez *Dictyostelium* pour sentir les forces mécaniques d'un flux et d'autres mécanismes mécanosensibles utilisant peut-être les microtubules ou la membrane plasmique et des canaux ioniques contrôlés mécaniquement sont envisageables. De tels canaux, contrôlés par la tension membranaire, ont récemment reçu beaucoup d'attention (pour des revues, voir Kung, 2005; Anishkin and Kung, 2005). Dans un gradient chimique, le processus de réorientation est qualitativement le même que sous flux. Quantitativement, les cellules agrégation-compétentes semblent réagir légèrement plus vite avec, en particulier, une solation du cytosquelette d'actine encore plus rapide.

Enfin, la mécanotransduction de l'amibe *Dictyostelium discoideum* joue probablement un rôle important pour sentir les particules voisines lors de la phagocytose ou les cellules voisines durant la morphogenèse qui a lieu dans le cycle de développement, ou encore pour sentir les flux de liquide provoqués par la pluie ou pour s'orienter lors de la migration dans son environnement naturel.

Malgré l'intérêt des comparaisons quantitatives entre expériences sous flux et expériences dans un gradient chimique, pour pouvoir véritablement identifier et comprendre les mécanismes moléculaires en jeu dans la mécanosensibilité de *Dictyostelium*, d'autres études sont nécessaires afin d'identifier la nature des mécanorécepteurs, de les localiser précisément dans la cellule et d'établir clairement quelles voies de signalisation sont activées par des forces mécaniques grâce à ces mécanorécepteurs. Quelles sont les protéines ou structures cellulaires qui jouent un rôle important pour sentir des forces mécaniques ? Par exemple, les études avec nocodazole sont très excitantes et devraient permettre de tester le rôle des microtubules dans la mécanosensibilité de *Dictyostelium*. En analysant le génome complètement séquencé de *Dictyostelium* (Eichinger et al., 2005), nous avons trouvé trois gènes partageant une certaine homologie avec des gènes codant pour des protéines dont il a été prouvé qu'elles jouaient un rôle important dans la mécanosensibilité d'autres organismes. Il s'agit d'un homologue de MEC (Gillespie and Walker, 2001), d'un homologue des protéines TRP (Corey et al., 2003), et d'un homologue des protéines de la famille des polycystines (Nauli et al., 2003). Ces gènes homologues à des gènes codant des mécanorécepteurs connus ouvrent de nouvelles pistes et de futures recherches avec l'amibe *D. discoideum* devraient s'attacher à vérifier si ils sont nécessaires à la réorganisation mécanosensible du cytosquelette de *Dictyostelium* et à la réorientation cellulaire sous flux. En particulier, il semble intéressant d'étudier l'éventuelle présence dans cet organisme de canaux mécaniquement activés.

D'autres études pourront permettre de comprendre quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la mécanotransduction de *Dictyostelium*. Un exemple d'expériences consiste à stimuler avec une contrainte de cisaillement des cellules exprimant la protéine CRAC-GFP, tout en dépolymérisant leur cytosquelette d'actine à l'aide de latrunculine-A. Cette expérience devrait permettre de répondre à la question suivante : « Le cytosquelette d'actine est-il indispensable pour sentir les forces mécaniques ? » et, si non, devrait permettre de savoir si l'on peut, dans le cas de la réponse à des forces mécaniques, distinguer sensibilité directionnelle et polarisation cellulaire, comme cela est le cas dans la réponse chimiotactique (Devreotes and Janetopoulos, 2003).

Dans un avenir proche, il serait intéressant de vérifier l'importance des voies de signalisation impliquant la PI3K. Dans la réponse chimiotactique, les protéines contenant des domaines PH sont recrutées à la membrane au front avant de la cellule grâce à l'accumulation de lipides PI(3,4,5)P₃, eux-mêmes produits grâce à l'activation localisée de la PI3K qui est, elle, activée par les protéines G. Une expérience consisterait en l'utilisation de cellules

mutantes $G\beta$ -null exprimant la CRAC-GFP et/ou la mRFP-Lim et à les stimuler mécaniquement à l'aide d'un flux de façon à vérifier si les protéines G sont indispensables dans la réponse mécanosensible pour éventuellement activer la PI3K. Des expériences sous flux avec des inhibiteurs des PI3Ks sont aussi envisageables.

Conclusion générale

Lors de mon travail de thèse, j'ai utilisé les deux approches qui consistent soit à étudier la cellule dans toute sa complexité, soit à étudier un système biomimétique artificiel et fonctionnalisé pour lui conférer des propriétés d'intérêt.

Les systèmes reconstitués fournissent des outils de test et éventuellement de validation de modèles expliquant des résultats expérimentaux obtenus en biologie moléculaire et cellulaire. Ils ont l'avantage d'être plus simples que la cellule et de permettre un meilleur contrôle des paramètres physiques caractéristiques. Ils sont constitués d'un jeu réduit de molécules (lipides, protéines, polymères, ...) permettant ainsi d'identifier le jeu minimum capable de reproduire le comportement cellulaire observé. Voir une cellule avec des yeux de médecins peut sembler délicat mais apporte de nouveaux concepts en biologie. Par contre, il peut être très difficile de fabriquer un système biomimétique de cellule, comme nous l'avons vu, par exemple, dans le cas d'une fonctionnalisation de liposomes pour les rendre spécifiquement adhésifs.

Si les systèmes reconstitués peuvent valider un modèle de fonctionnement d'un mécanisme particulier de la cellule, il faut bien garder en tête l'existence d'une différence fondamentale entre ces systèmes artificiels qui sont passifs et les cellules vivantes actives, qui réagissent aux contraintes extérieures et s'y adaptent. Par exemple, l'application d'une pression hyperosmotique et le dégonflement successif ont été étudiés avec des liposomes (Boroske et al., 1981; Viallat et al., 2004) et avec des cellules vivantes (dont *Dictyostelium* ; Kuwayama et al., 1996 , Zischka et al., 1999). Alors que les liposomes, contenant ou non un gel dans leur volume intérieur pour éventuellement leur conférer des propriétés viscoélastiques, se dégonflent passivement en expulsant de l'eau à travers la membrane (Boroske et al., 1981; Viallat et al., 2004), au contraire, les cellules *Dictyostelium* répondent à un choc osmotique en activant de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, un choc osmotique provoque une augmentation de la concentration de cGMP qui entraîne une phosphorylation des chaînes lourdes de la myosine-II et une redistribution de cette protéine tout autour du cortex (Kuwayama et al., 1996). La protéine DdLim et l'actine sont aussi régulées (Zischka et al., 1999) et les cellules présentent un pic de la concentration d'AMPc intracellulaire (Ott et al., 2000) en réponse à un choc osmotique. Ceci met bien en évidence la différence entre un système passif et un système actif, vivant. Alors que le système passif évolue vers un état d'équilibre défini par les propriétés physiques qui le caractérisent, le système actif est toujours hors équilibre et se comporte activement (en utilisant de l'énergie)

en fonction de son environnement et en adaptant sa réponse en permanence. Les systèmes vivants sont donc extrêmement compliqués et peuvent parfois dérouter le physicien qui cherchera la simplification.

Les deux approches (systèmes reconstitués, systèmes vivants) sont donc complémentaires et chacune apporte un certain type d'informations. L'étude des systèmes vivants est indispensable pour percevoir toute leur complexité et éclairer pas à pas l'immensité des réponses et des réseaux de signalisation. L'étude des systèmes reconstitués est précieuse pour valider des modèles qui découlent des études précédemment citées et pour caractériser plus quantitativement et dans un cadre mieux contrôlé le fonctionnement d'un élément particulier extrait de la cellule.

Références

- Abkarian, M. 2002. Dynamique et formes d'enveloppes déformables sous champs externes: vésicules et globules rouges. *PhD Thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, France.*
- Abkarian, M., C. Lartigue, and A. Viallat. 2002. Tank treading and unbinding of deformable vesicles in shear flow: determination of the lift force. *Phys Rev Lett.* 88:068103.
- Aguado-Velasco, C., and M.S. Bretscher. 1997. Dictyostelium myosin II null mutant can still cap Con A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9684-6.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd edition. *Garland Publishing Inc., NY.*
- Alenghat, F.J., S.M. Nauli, R. Kolb, J. Zhou, and D.E. Ingber. 2004. Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res.* 301:23-30.
- Almeida, P.F., W.L. Vaz, and T.E. Thompson. 1992. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry.* 31:6739-47.
- Angelova, M.I., S. Soléau, P. Méléard, J. Faucon, and P. Bothorel. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89:127-133.
- Anishkin, A., and C. Kung. 2005. Microbial mechanosensation. *Curr Opin Neurobiol.* 15:397-405.
- Arnott, S., A. Fulmer, W.E. Scott, I.C. Dea, R. Moorhouse, and D.A. Rees. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J Mol Biol.* 90:269-84.
- Ashworth, J.M. 1971. Cell development in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Symp Soc Exp Biol.* 25:27-49.
- Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11984-9.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Benoit, M., D. Gabriel, G. Gerisch, and H.E. Gaub. 2000. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol.* 2:313-7.
- Bernard, A.-L. 1999. Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation: perceuse moléculaire et autres exemples. *PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.*
- Bernard, A.-L., M.-A. Guedeau-Boudeville, O. Sandre, S. Palacin, J.-M. di Meglio, and L. Jullien. 2000. Permeation through lipid bilayers by adhesion of giant vesicles on decorated surfaces. *Langmuir.* 16:6801-6808.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carrier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:677-95.
- Blount, P., S.I. Sukharev, P.C. Moe, B. Martinac, and C. Kung. 1999. Mechanosensitive channels of bacteria. *Methods Enzymol.* 294:458-82.
- Bonner, J.T., and D.S. Lamont. 2005. Behavior of cellular slime molds in the soil. *Mycologia.* 97:178-84.
- Borisy, G.G., and T.M. Svitkina. 2000. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 12:104-12.

- Boroske, E., M. Elwenspoek, and W. Helfrich. 1981. Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys J.* 34:95-109.
- Bosgraaf, L., H. Russcher, J.L. Smith, D. Wessels, D.R. Soll, and P.J. Van Haastert. 2002. A novel cGMP signalling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in Dictyostelium. *Embo J.* 21:4560-70.
- Boudaoud, A., and S. Chaieb. 2003. Mechanical phase diagram of shrinking cylindrical gels. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 68:021801.
- Boulbitch, A., Z. Guttenberg, and E. Sackmann. 2001. Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys J.* 81:2743-51.
- Boulbitch, A., R. Simson, D.A. Simson, R. Merkel, W. Hackl, M. Barmann, and E. Sackmann. 2000. Shape instability of a biomembrane driven by a local softening of the underlying actin cortex. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 62:3974-85.
- Bozzaro, S., and E. Ponte. 1995. Cell adhesion in the life cycle of Dictyostelium. *Experientia.* 51:1175-88.
- Bray, D. 1992. Cell movements, from molecules to motility. *Garland Publishing Inc., NY.*
- Bretscher, M.S., and C. Aguado-Velasco. 1998. Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol.* 10:537-41.
- Bretschneider, T., S. Diez, K. Anderson, J. Heuser, M. Clarke, A. Muller-Taubenberger, J. Kohler, and G. Gerisch. 2004. Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr Biol.* 14:1-10.
- Bretschneider, T., J. Jonkman, J. Kohler, O. Medalia, K. Barisic, I. Weber, E.H. Stelzer, W. Baumeister, and G. Gerisch. 2002. Dynamic organization of the actin system in the motile cells of Dictyostelium. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:639-49.
- Bruckert, F., E. Decave, D. Garrivier, P. Cosson, Y. Brechet, B. Fourcade, and M. Satre. 2002. Dictyostelium discoideum adhesion and motility under shear flow: experimental and theoretical approaches. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:651-8.
- Burger, E.H., and J. Klein-Nulend. 1999. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J.* 13 Suppl:S101-12.
- Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 4:487-525.
- Cabane, B., and S. Hénon. 2003. Liquides. Solutions, dispersions, émulsions, gels. *Editions Belin, Paris.*
- Cameron, L.A., M.J. Footer, A. van Oudenaarden, and J.A. Theriot. 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4908-13.
- Campbell, R.E., O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7877-82.
- Canham, P.B. 1970. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J Theor Biol.* 26:61-81.
- Cantat, I., and C. Misbah. 1999. Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys. Rev. Lett.* 83:880-884.
- Carlier, M.F. 1998. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 10:45-51.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-22.

- Carrier, M.F., C. Le Clainche, S. Wiesner, and D. Pantaloni. 2003. Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays*. 25:336-45.
- Chadwick, C.M., J.E. Ellison, and D.R. Garrod. 1984. Dual role for Dictyostelium contact site B in phagocytosis and developmental size regulation. *Nature*. 307:646-7.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-5.
- Chemin, J., A.J. Patel, F. Duprat, I. Lauritzen, M. Lazdunski, and E. Honore. 2005. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *Embo J*. 24:44-53.
- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*. 276:1425-8.
- Chen, P., B.D. Ostrow, S.R. Tafuri, and R.L. Chisholm. 1994. Targeted disruption of the Dictyostelium RMLC gene produces cells defective in cytokinesis and development. *J Cell Biol*. 127:1933-44.
- Chia, C.P. 1996. A 130-kDa plasma membrane glycoprotein involved in Dictyostelium phagocytosis. *Exp Cell Res*. 227:182-9.
- Chia, C.P., S. Gomathinayagam, R.J. Schmaltz, and L.K. Smoyer. 2005. Glycoprotein gp130 of dictyostelium discoideum influences macropinocytosis and adhesion. *Mol Biol Cell*. 16:2681-93.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1994. Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J Cell Sci*. 107 (Pt 12):3643-54.
- Chung, C.Y., and R.A. Firtel. 1999. PAKa, a putative PAK family member, is required for cytokinesis and the regulation of the cytoskeleton in Dictyostelium discoideum cells during chemotaxis. *J Cell Biol*. 147:559-76.
- Chung, C.Y., S. Funamoto, and R.A. Firtel. 2001. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci*. 26:557-66.
- Cibert, C. 2005. Fondamentaux d'optique et d'imagerie numérique à l'usage des microscopistes. *Cépaduès-éditions*.
- Clarke, M., J. Kohler, J. Heuser, and G. Gerisch. 2002. Endosome fusion and microtubule-based dynamics in the early endocytic pathway of dictyostelium. *Traffic*. 3:791-800.
- Clarke, M., and J.A. Spudich. 1974. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. Isolation and characterization of myosin from amoebae of Dictyostelium discoideum. *J Mol Biol*. 86:209-22.
- Coates, J.C., and A.J. Harwood. 2001. Cell-cell adhesion and signal transduction during Dictyostelium development. *J Cell Sci*. 114:4349-58.
- Comer, F.I., and C.A. Parent. 2002. PI 3-kinases and PTEN: how opposites chemoattract. *Cell*. 109:541-4.
- Condeelis, J. 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol*. 9:411-44.
- Corey, D.P. 2003. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron*. 39:585-8.
- Corey, D.P., J. Garcia-Anoveros, J.R. Holt, K.Y. Kwan, S.Y. Lin, M.A. Vollrath, A. Amalfitano, E.L. Cheung, B.H. Derfler, A. Duggan, G.S. Geleoc, P.A. Gray, M.P. Hoffman, H.L. Rehm, D. Tamasauskas, and D.S. Zhang. 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*. 432:723-30.

- Cornillon, S., L. Gebbie, M. Benghezal, P. Nair, S. Keller, B. Wehrle-Haller, S.J. Charette, F. Bruckert, F. Letourneur, and P. Cosson. 2006. An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep.*
- Coughlin, M.F., and G.W. Schmid-Schonbein. 2004. Pseudopod projection and cell spreading of passive leukocytes in response to fluid shear stress. *Biophys J.* 87:2035-42.
- Cozens-Roberts, C., J.A. Quinn, and D.A. Lauffenburger. 1990. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys J.* 58:857-72.
- Davies, P.F. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75:519-60.
- Davies, P.F., K.A. Barbee, M.V. Volin, A. Robotewskyj, J. Chen, L. Joseph, M.L. Griem, M.N. Wernick, E. Jacobs, D.C. Polacek, N. dePaola, and A.I. Barakat. 1997. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 59:527-49.
- Davies, P.F., D.C. Polacek, C. Shi, and B.P. Helmke. 2002. The convergence of haemodynamics, genomics, and endothelial structure in studies of the focal origin of atherosclerosis. *Biorheology.* 39:299-306.
- De La Cruz, E.M., E.M. Ostap, R.A. Brundage, K.S. Reddy, H.L. Sweeney, and D. Safer. 2000. Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. *Biophys J.* 78:2516-27.
- De la Roche, M.A., J.L. Smith, V. Betapudi, T.T. Egelhoff, and G.P. Cote. 2002. Signaling pathways regulating Dictyostelium myosin II. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:703-18.
- De Lozanne, A., M. Lewis, J.A. Spudich, and L.A. Leinwand. 1985. Cloning and characterization of a nonmuscle myosin heavy chain cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:6807-10.
- De Lozanne, A., and J.A. Spudich. 1987. Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science.* 236:1086-91.
- de Priester, W., P. Riegman, and A. Vonk. 1988. Effects of microtubule-disrupting agents on chemotactic events in Dictyostelium discoideum. *Eur J Cell Biol.* 46:94-97.
- Decave, E., D. Garrivier, Y. Brechet, B. Fourcade, and F. Bruckert. 2002. Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J.* 82:2383-95.
- Decave, E., D. Rieu, J. Dalous, S. Fache, Y. Brechet, B. Fourcade, M. Satre, and F. Bruckert. 2003. Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci.* 116:4331-43.
- Dembo, M., and Y.L. Wang. 1999. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J.* 76:2307-16.
- Desbarats, L., S.K. Brar, and C.H. Siu. 1994. Involvement of cell-cell adhesion in the expression of the cell cohesion molecule gp80 in Dictyostelium discoideum. *J Cell Sci.* 107 (Pt 6):1705-12.
- Devreotes, P., and C. Janetopoulos. 2003. Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem.* 278:20445-8.
- Devreotes, P.N., and S.H. Zigmond. 1988. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol.* 4:649-86.
- Didry, D., M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 1998. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem.* 273:25602-11.
- Diez, S., G. Gerisch, K. Anderson, A. Muller-Taubenberger, and T. Bretschneider. 2005. Subsecond reorganization of the actin network in cell motility and chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:7601-6.

- Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 310:1139-43.
- Döbereiner, H.-G., E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, and M. Wortis. 1997. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Physical Review E*. 55(4):4458-4474.
- Dobereiner, H.G., J. Kas, D. Noppl, I. Sprenger, and E. Sackmann. 1993. Budding and fission of vesicles. *Biophys J*. 65:1396-403.
- Dormann, D., T. Libotte, C.J. Weijer, and T. Bretschneider. 2002. Simultaneous quantification of cell motility and protein-membrane-association using active contours. *Cell Motil Cytoskeleton*. 52:221-30.
- Dusek, K., and W. Prins. 1969. Structure and elasticity of non-crystalline polymer networks. *Adv. Pol. Sci*. 6:1-102.
- Eddy, R.J., L.M. Pierini, and F.R. Maxfield. 2002. Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration. *Mol Biol Cell*. 13:4470-83.
- Egelhoff, T.T., S.S. Brown, and J.A. Spudich. 1991. Spatial and temporal control of nonmuscle myosin localization: identification of a domain that is necessary for myosin filament disassembly in vivo. *J Cell Biol*. 112:677-88.
- Eichinger, L., S.S. Lee, and M. Schleicher. 1999. Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech*. 47:124-34.
- Eichinger, L., J.A. Pachebat, G. Glockner, M.A. Rajandream, R. Sugang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B.A. Konfortov, F. Rivero, A.T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M.A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabbinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E.C. Cox, R.L. Chisholm, R. Gibbs, W.F. Loomis, M. Platzer, R.R. Kay, J. Williams, P.H. Dear, A.A. Noegel, B. Barrell, and A. Kuspa. 2005. The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature*. 435:43-57.
- Elbaum, M., A. Chausovsky, E.T. Levy, M. Shtutman, and A.D. Bershadsky. 1999. Microtubule involvement in regulating cell contractility and adhesion-dependent signalling: a possible mechanism for polarization of cell motility. *Biochem Soc Symp*. 65:147-72.
- Elgsaeter, A., B.T. Stokke, A. Mikkelsen, and D. Branton. 1986. The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*. 234(4781):1217-23.
- Elliott, S., G.H. Joss, A. Spudich, and K.L. Williams. 1993. Patterns in Dictyostelium discoideum: the role of myosin II in the transition from the unicellular to the multicellular phase. *J Cell Sci*. 104 (Pt 2):457-66.
- Escalante, R., D. Wessels, D.R. Soll, and W.F. Loomis. 1997. Chemotaxis to cAMP and slug migration in Dictyostelium both depend on migA, a BTB protein. *Mol Biol Cell*. 8:1763-75.
- Etienne-Manneville, S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*. 5:470-7.

- Etzrodt, M., H.C. Ishikawa, J. Dalous, A. Muller-Taubenberger, T. Bretschneider, and G. Gerisch. 2006. Time-resolved responses to chemoattractant, characteristic of the front and tail of Dictyostelium cells. *FEBS Lett.* 580:6707-13.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1984. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature.* 310:58-61.
- Evans, E. 1995. Physical actions in biological adhesion (chap.15). *In Structure and Dynamics of Membranes, From Cells to Vesicles, vol.1B.* Ed. R. Lipowsky and E. Sackmann. Elsevier Science, Amsterdam.
- Evans, E., and W. Rawicz. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters.* 64:2094-2097.
- Evans, E., K. Ritchie, and R. Merkel. 1995. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys J.* 68:2580-7.
- Fache, S., J. Dalous, M. Englund, C. Hansen, F. Chamaraux, B. Fourcade, M. Satre, P. Devreotes, and F. Bruckert. 2005. Calcium mobilization stimulates Dictyostelium discoideum shear-flow-induced cell motility. *J Cell Sci.* 118:3445-57.
- Fechheimer, M., and S.H. Zigmond. 1993. Focusing on unpolymerized actin. *J Cell Biol.* 123:1-5.
- Fettiplace, R. 1978. The influence of the lipid on the water permeability of artificial membranes. *Biochim Biophys Acta.* 513:1-10.
- Fey, P., S. Stephens, M.A. Titus, and R.L. Chisholm. 2002. SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium. *J Cell Biol.* 159:1109-19.
- Finer, J.T., R.M. Simmons, and J.A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature.* 368:113-9.
- Firtel, R.A., and C.Y. Chung. 2000. The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays.* 22:603-15.
- Fischer, M., I. Haase, E. Simmeth, G. Gerisch, and A. Muller-Taubenberger. 2004. A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in Dictyostelium. *FEBS Lett.* 577:227-32.
- Flory, P.J. 1953. Principles of polymer chemistry. *Cornell University Press, Ithaca, NY.*
- Forscher, P. 1989. Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *Trends Neurosci.* 12:468-74.
- Fradkov, A.F., Y. Chen, L. Ding, E.V. Barsova, M.V. Matz, and S.A. Lukyanov. 2000. Novel fluorescent protein from Discosoma coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett.* 479:127-30.
- Fujiwara, I., S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata. 2002. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol.* 4:666-73.
- Fukui, Y. 1990. Actomyosin organization in mitotic Dictyostelium amoebae. *Ann N Y Acad Sci.* 582:156-65.
- Fukui, Y., E. de Hostos, S. Yumura, T. Kitanishi-Yumura, and Inou. 1999. Architectural dynamics of F-actin in eupodia suggests their role in invasive locomotion in Dictyostelium. *Exp Cell Res.* 249:33-45.
- Fukui, Y., and S. Inoue. 1997. Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskeleton.* 36:339-54.
- Fukui, Y., J. Murray, K.S. Riddelle, and D.R. Soll. 1991. Cell behavior and actomyosin organization in Dictyostelium during substrate exploration. *Cell Struct Funct.* 16:289-301.
- Fukui, Y., T.Q. Uyeda, C. Kitayama, and S. Inoue. 2000. How well can an amoeba climb? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10020-5.

- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*. 109:611-23.
- Galbraith, C.G., and M.P. Sheetz. 1997. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:9114-8.
- Galbraith, C.G., and M.P. Sheetz. 1999. Keratocytes pull with similar forces on their dorsal and ventral surfaces. *J Cell Biol*. 147:1313-24.
- Gao, E.N., P. Shier, and C.H. Siu. 1992. Purification and partial characterization of a cell adhesion molecule (gp150) involved in postaggregation stage cell-cell binding in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 267:9409-15.
- Gaub, H., E. Sackmann, R. Buschl, and H. Ringsdorf. 1984. Lateral diffusion and phase separation in two-dimensional solutions of polymerized butadiene lipid in dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. A photobleaching and freeze fracture study. *Biophys J*. 45:725-31.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 110:139-42.
- Gerisch, G. 1982. Chemotaxis in *Dictyostelium*. *Annu Rev Physiol*. 44:535-52.
- Gerisch, G., R. Albrecht, C. Heizer, S. Hodgkinson, and M. Maniak. 1995. Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. *Curr Biol*. 5:1280-5.
- Gerisch, G., and H.U. Keller. 1981. Chemotactic reorientation of granulocytes stimulated with micropipettes containing fMet-Leu-Phe. *J Cell Sci*. 52:1-10.
- Gerisch, G., and A. Muller-Taubenberger. 2003. GFP-fusion proteins as fluorescent reporters to study organelle and cytoskeleton dynamics in chemotaxis and phagocytosis. *Methods Enzymol*. 361:320-37.
- Giganti, A., J. Plastino, B. Janji, M. Van Troys, D. Lentz, C. Ampe, C. Sykes, and E. Friederich. 2005. Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement. *J Cell Sci*. 118:1255-65.
- Gillespie, P.G., and R.G. Walker. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*. 413:194-202.
- Gimsa, J., and C. Ried. 1995. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Mol Membr Biol*. 12:247-54.
- Gingell, D., and N. Owens. 1992. How do cells sense and respond to adhesive contacts? Diffusion-trapping of laterally mobile membrane proteins at maturing adhesions may initiate signals leading to local cytoskeletal assembly response and lamella formation. *J Cell Sci*. 101 (Pt 2):255-66.
- Glogauer, M., P. Arora, G. Yao, I. Sokholov, J. Ferrier, and C.A. McCulloch. 1997. Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci*. 110 (Pt 1):11-21.
- Glogauer, M., J. Ferrier, and C.A. McCulloch. 1995. Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated Ca²⁺ flux in fibroblasts. *Am J Physiol*. 269:C1093-104.
- Goldman, A.J., R.G. Cox, and H. Brenner. 1967. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane. *Chem. Eng. Sci*. 22:637-660.
- Gudi, S., J.P. Nolan, and J.A. Frangos. 1998. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2515-9.
- Gudi, S.R., C.B. Clark, and J.A. Frangos. 1996. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res*. 79:834-9.

- Guttenberg, Z., B. Lorz, E. Sackmann, and A. Boulbitch. 2001. First order transition between adhesion states in a system mimicking cell-tissue interaction. *Europhys Lett.* 54:826–832.
- Guyon, E., J.-P. Hulin, and L. Petit. 2001. Hydrodynamique physique. *EDP Sciences-CNRS Editions.*
- Häckl, W., M. Baermann, and E. Sackmann. 1998. Shape changes of self-assembled actin bilayer composite membranes. *Phys. Rev. Lett.* 80:1786–1789.
- Hadwiger, J.A., and R.A. Firtel. 1992. Analysis of G alpha 4, a G-protein subunit required for multicellular development in Dictyostelium. *Genes Dev.* 6:38-49.
- Haidekker, M.A., N. L'Heureux, and J.A. Frangos. 2000. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H1401-6.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-14.
- Hamill, O.P., and B. Martinac. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* 81:685-740.
- Hammer, D.A., and D.A. Lauffenburger. 1987. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys J.* 52:475-87.
- Hardin, J., and T. Walston. 2004. Models of morphogenesis: the mechanisms and mechanics of cell rearrangement. *Curr Opin Genet Dev.* 14:399-406.
- Harris, A.K., P. Wild, and D. Stopak. 1980. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science.* 208:177-9.
- Hase, C.C., A.C. Le Dain, and B. Martinac. 1995. Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of Escherichia coli. *J Biol Chem.* 270:18329-34.
- Hecht, A.-M., and E. Geissler. 1980. Gel deswelling under reverse osmosis. *J Chem Phys.* 73(8):4077-4080.
- Heim, R., A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature.* 373:663-4.
- Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12501-4.
- Helfer, E., S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F.C. MacKintosh, and D. Chatenay. 2001. Viscoelastic properties of actin-coated membranes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 63:021904.
- Helfrich, W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C].* 28:693-703.
- Helmke, B.P., and P.F. Davies. 2002. The cytoskeleton under external fluid mechanical forces: hemodynamic forces acting on the endothelium. *Ann Biomed Eng.* 30:284-96.
- Hestermann, A., M. Rehberg, and R. Graf. 2002. Centrosomal microtubule plus end tracking proteins and their role in Dictyostelium cell dynamics. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:621-30.
- Higgs, H.N., L. Blanchoin, and T.D. Pollard. 1999. Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry.* 38:15212-22.
- Hildebrand, A., A. Schaedlich, U. Rothe, and R.H. Neubert. 2002. Sensing specific adhesion of liposomal and micellar systems with attached carbohydrate recognition structures at lectin surfaces. *J Colloid Interface Sci.* 249:274-81.
- Homan, R., and H.J. Pownall. 1988. Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length. *Biochim Biophys Acta.* 938:155-66.

- Howard, J., and A.J. Hudspeth. 1988. Compliance of the hair bundle associated with gating of mechanoelectrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron*. 1:189-99.
- Howard, P.K., K.G. Ahern, and R.A. Firtel. 1988. Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum. *Nucleic Acids Res.* 16:2613-23.
- Hsu, P.P., S. Li, Y.S. Li, S. Usami, A. Ratcliffe, X. Wang, and S. Chien. 2001. Effects of flow patterns on endothelial cell migration into a zone of mechanical denudation. *Biochem Biophys Res Commun.* 285:751-9.
- Hu, H., and F. Sachs. 1996. Mechanically activated currents in chick heart cells. *J Membr Biol.* 154:205-16.
- Huang, S., and D.E. Ingber. 2005. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell.* 8:175-6.
- Humphrey, D., C. Duggan, D. Saha, D. Smith, and J. Kas. 2002. Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature.* 416:413-6.
- Huster, D., A.J. Jin, K. Arnold, and K. Gawrisch. 1997. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ¹⁷O NMR. *Biophys J.* 73:855-64.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Iglic, A. 1997. A possible mechanism determining the stability of spiculated red blood cells. *J Biomech.* 30:35-40.
- Iijima, M., Y.E. Huang, and P. Devreotes. 2002. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev Cell.* 3:469-78.
- Ilavsky, M., J. Hrouz, J. Stejskal, and K. Bouchal. 1984. Phase transition in swollen gels. 6. Effect of aging on the extent of hydrolysis of aqueous polyacrylamide solutions and on the collapse of gels. *Macromolecules.* 17:2868-2874.
- Indovina, P., E. Tettamani, and M. Micciancio-Giammarinaro. 1979. Thermal hysteresis and reversibility of gel-sol transition in agarose-water systems. *J Chem Phys.* 6:70.
- Ingber, D.E. 1993. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci.* 104 (Pt 3):613-27.
- Ingber, D.E. 1997. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 59:575-99.
- Ingber, D.E. 2006. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int J Dev Biol.* 50:255-66.
- Insall, R., A. Muller-Taubenberger, L. Machesky, J. Kohler, E. Simmeth, S.J. Atkinson, I. Weber, and G. Gerisch. 2001. Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 50:115-28.
- Insall, R.H., J. Borleis, and P.N. Devreotes. 1996. The aimless RasGEF is required for processing of chemotactic signals through G-protein-coupled receptors in Dictyostelium. *Curr Biol.* 6:719-29.
- Ishijima, A., Y. Harada, H. Kojima, T. Funatsu, H. Higuchi, and T. Yanagida. 1994. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 199:1057-63.
- Israelachvili, J.N. 1995. Intermolecular and surface forces. *London, Academic Press*
- Janetopoulos, C., L. Ma, P.N. Devreotes, and P.A. Iglesias. 2004. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8951-6.
- Janmey, P.A. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol.* 56:169-91.
- Jay, A.W. 1975. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys J.* 15:205-22.

- Jay, P.Y., and E.L. Elson. 1992. Surface particle transport mechanism independent of myosin II in *Dictyostelium*. *Nature*. 356:438-40.
- Jay, P.Y., C. Pasternak, and E.L. Elson. 1993. Studies of mechanical aspects of amoeboid locomotion. *Blood Cells*. 19:375-86; discussion 386-8.
- Jay, P.Y., P.A. Pham, S.A. Wong, and E.L. Elson. 1995. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci*. 108 (Pt 1):387-93.
- Kabsch, W., H.G. Mannherz, D. Suck, E.F. Pai, and K.C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*. 347:37-44.
- Karatekin, E., O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.H. Puech, and F. Brochard-Wyart. 2003. Cascades of transient pores in giant vesicles: line tension and transport. *Biophys J*. 84:1734-49.
- Karl, I., and J. Bereiter-Hahn. 1999. Tension modulates cell surface motility: A scanning acoustic microscopy study. *Cell Motil Cytoskeleton*. 43:349-59.
- Kas, J., and E. Sackmann. 1991. Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys J*. 60:825-44.
- Kass, M., A. Witkin, and D. Terzopoulos. 1987. Snakes: Active Contour Models. *International Journal of Computer Vision*. 1:321-331.
- Katsumi, A., J. Milanini, W.B. Kiousses, M.A. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol*. 158:153-64.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*. 34:746-61.
- Kazalov, S., M. Kaholek, I. Teraoka, and K. Levon. 2002. UV-gelation on nanometer scale using liposome reactor. *Macromolecules*. 35:1911-1920.
- Kelleher, J.F., S.J. Atkinson, and T.D. Pollard. 1995. Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*. 131:385-97.
- Keller, H.U., and H. Bebie. 1996. Protrusive activity quantitatively determines the rate and direction of cell locomotion. *Cell Motil Cytoskeleton*. 33:241-51.
- Keller, M., R. Tharmann, M.A. Dichtl, A.R. Bausch, and E. Sackmann. 2003. Slow filament dynamics and viscoelasticity in entangled and active actin networks. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 361:699-711; discussion 711-2.
- Kiehart, D.P., C.G. Galbraith, K.A. Edwards, W.L. Rickoll, and R.A. Montague. 2000. Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 149:471-90.
- Kimble, M., C. Kuzmiak, K.N. McGovern, and E.L. de Hostos. 2000. Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in *dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 47:48-62.
- Kimmel, A.R., and C.A. Parent. 2003. The signal to move: *D. discoideum* go orienteering. *Science*. 300:1525-7.
- Klein-Nulend, J., R.G. Bacabac, and M.G. Mullender. 2005. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)*. 53:576-80.
- Kloboucek, A., A. Behrisch, J. Faix, and E. Sackmann. 1999. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: A model membrane study. *Biophys J*. 77:2311-28.
- Kloda, A., and B. Martinac. 2001. Molecular identification of a mechanosensitive channel in archaea. *Biophys J*. 80:229-40.
- Klosgen, B., and W. Helfrich. 1997. Cryo-transmission electron microscopy of a superstructure of fluid dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) membranes. *Biophys J*. 73:3016-29.

- Knecht, D.A., D.L. Fuller, and W.F. Loomis. 1987. Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.* 121:277-83.
- Knecht, D.A., and W.F. Loomis. 1987. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science.* 236:1081-6.
- Kocks, C., R. Hellio, P. Gounon, H. Ohayon, and P. Cossart. 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci.* 105 (Pt 3):699-710.
- Koonce, M.P., and A. Khodjakov. 2002. Dynamic microtubules in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:613-9.
- Koonce, M.P., J. Kohler, R. Neujahr, J.M. Schwartz, I. Tikhonenko, and G. Gerisch. 1999. Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *Embo J.* 18:6786-92.
- Koonce, M.P., and J.R. McIntosh. 1990. Identification and immunolocalization of cytoplasmic dynein in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 15:51-62.
- Koonce, M.P., and M. Samso. 1996. Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* 7:935-48.
- Kreitmeier, M., G. Gerisch, C. Heizer, and A. Muller-Taubenberger. 1995. A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol.* 129:179-88.
- Kron, S.J., and J.A. Spudich. 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6272-6.
- Kummrow, M., and W. Helfrich. 1996. Collapse of giant phosphatidylcholine vesicles. *Chem. Phys. Lipids.* 79:147-156.
- Kung, C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature.* 436:647-54.
- Kuo, S.C., and D.A. Lauffenburger. 1993. Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys J.* 65:2191-200.
- Kuriyama, R., C. Sato, Y. Fukui, and S. Nishibayashi. 1982. In vitro nucleation of microtubules from microtubule-organizing center prepared from cellular slime mold. *Cell Motil.* 2:257-72.
- Kuwayama, H., M. Ecke, G. Gerisch, and P.J. Van Haastert. 1996. Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation. *Science.* 271:207-9.
- Labas, Y.A., N.G. Gurskaya, Y.G. Yanushevich, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, S.A. Lukyanov, and M.V. Matz. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4256-61.
- Ladam, G., L. Vonna, and E. Sackmann. 2005. Protrusion force transmission of amoeboid cells crawling on soft biological tissue. *Acta Biomater.* 1:485-97.
- Laevsky, G., and D.A. Knecht. 2003. Cross-linking of actin filaments by myosin II is a major contributor to cortical integrity and cell motility in restrictive environments. *J Cell Sci.* 116:3761-70.
- Langille, B.L., and F. O'Donnell. 1986. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science.* 231:405-7.
- Lansman, J.B., T.J. Hallam, and T.J. Rink. 1987. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature.* 325:811-3.
- Lauritzen, I., J. Chemin, E. Honore, M. Jodar, N. Guy, M. Lazdunski, and A. Jane Patel. 2005. Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* 6:642-8.
- Lee, J., A. Ishihara, G. Oxford, B. Johnson, and K. Jacobson. 1999. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature.* 400:382-6.

- Lee, J., A. Ishihara, J.A. Theriot, and K. Jacobson. 1993. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature*. 362:167-71.
- Lee, J., M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson. 1994. Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*. 127:1957-64.
- Lehtonen, J.Y., and P.K. Kinnunen. 1995. Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys J*. 68:1888-94.
- Letherby, M.R., and Y.D. A. 1981. The Gelation of Agarose. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*. 77:1953-1966.
- Levi, S., M.V. Polyakov, and T.T. Egelhoff. 2002. Myosin II dynamics in Dictyostelium: determinants for filament assembly and translocation to the cell cortex during chemoattractant responses. *Cell Motil Cytoskeleton*. 53:177-88.
- Li, S., P. Butler, Y. Wang, Y. Hu, D.C. Han, S. Usami, J.L. Guan, and S. Chien. 2002. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3546-51.
- Li, S., N.F. Huang, and S. Hsu. 2005. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem*. 96:1110-26.
- Li, Z., M. Hannigan, Z. Mo, B. Liu, W. Lu, Y. Wu, A.V. Smrcka, G. Wu, L. Li, M. Liu, C.K. Huang, and D. Wu. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*. 114:215-27.
- Liang, W., L. Licate, H. Warrick, J. Spudich, and T. Egelhoff. 2002. Differential localization in cells of myosin II heavy chain kinases during cytokinesis and polarized migration. *BMC Cell Biol*. 3:19.
- Lim, G.H.W., M. Wortis, and R. Mukhopadhyay. 2002. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer–couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(26):16766–16769.
- Limozin, L., and E. Sackmann. 2002. Polymorphism of cross-linked actin networks in giant vesicles. *Phys Rev Lett*. 89:168103.
- Linder, S., and P. Kopp. 2005. Podosomes at a glance. *J Cell Sci*. 118:2079-82.
- Lippincott-Schwartz, J., and G.H. Patterson. 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*. 300:87-91.
- Lo, C.M., H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*. 79:144-52.
- Loomis, W.F. 1982. The development of *Dictyostelium discoideum*. *Academic Press, NY*.
- Lotan, R., E. Skutelsky, D. Danon, and N. Sharon. 1975. The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem*. 250:8518-8523.
- Lukyanov, K.A., A.F. Fradkov, N.G. Gurskaya, M.V. Matz, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, M.L. Markelov, A.G. Zarsky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, and S.A. Lukyanov. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J Biol Chem*. 275:25879-82.
- Ma, S., L. Trivinos-Lagos, R. Graf, and R.L. Chisholm. 1999. Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interaction is required for interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in Dictyostelium. *J Cell Biol*. 147:1261-74.
- Machesky, L.M., S.J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T.D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*. 127:107-15.

- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 8:1347-56.
- Machesky, L.M., R.D. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3739-44.
- Machesky, L.M., E. Reeves, F. Wientjes, F.J. Mattheyse, A. Grogan, N.F. Totty, A.L. Burlingame, J.J. Hsuan, and A.W. Segal. 1997. Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J.* 328 (Pt 1):105-12.
- Malek, A.M., and S. Izumo. 1996. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.* 109 (Pt 4):713-26.
- Mallipattu, S.K., M.A. Haidekker, P. Von Dassow, M.I. Latz, and J.A. Frangos. 2002. Evidence for shear-induced increase in membrane fluidity in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 188:409-16.
- Manstein, D.J., M.A. Titus, A. De Lozanne, and J.A. Spudich. 1989. Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *Embo J.* 8:923-32.
- Marcy, Y., J. Prost, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2004. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5992-7.
- Mark, J., and B. Erman. 1988. Rubberlike Elasticity, a Molecular Primer. *John Wiley, New York.*
- Martinac, B., M. Buechner, A.H. Delcour, J. Adler, and C. Kung. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2297-301.
- Mathivet, L., S. Cribier, and P.F. Devaux. 1996. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J.* 70:1112-21.
- Matsuo, E.S., and T. Tanaka. 1988. Kinetics of discontinuous volume-phase transition of gels. *J Chem Phys.* 89(3):1695-1703.
- Matsuo, E.S., and T. Tanaka. 1992. Patterns in shrinking gels. *Nature.* 358:482-485.
- Matz, M.V., A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zarskiy, M.L. Markelov, and S.A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol.* 17:969-73.
- McBride, D.W., Jr., and O.P. Hamill. 1992. Pressure-clamp: a method for rapid step perturbation of mechanosensitive channels. *Pflugers Arch.* 421:606-12.
- McIntosh, J.R., U.P. Roos, B. Neighbors, and K.L. McDonald. 1985. Architecture of the microtubule component of mitotic spindles from *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci.* 75:93-129.
- McRobbie, S.J., and P.C. Newell. 1985. Effects of cytochalasin B on cell movements and chemoattractant-elicited actin changes of *Dictyostelium*. *Exp Cell Res.* 160:275-86.
- Meili, R., and R.A. Firtel. 2003. Two poles and a compass. *Cell.* 114:153-6.
- Miao, L., B. Fourcade, M. Rao, M. Wortis, and R.K. Zia. 1991. Equilibrium budding and vesiculation in the curvature model of fluid lipid vesicles. *Physical Review. A.* 43:6843-6856.
- Miao, L., U. Seifert, M. Wortis, and H.G. Dobereiner. 1994. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics.* 49:5389-5407.

- Middleton, C.A., A.F. Brown, R.M. Brown, I.D. Karavanova, D.J. Roberts, and J.M. Vasiliev. 1989. The polarization of fibroblasts in early primary cultures is independent of microtubule integrity. *J Cell Sci.* 94 (Pt 1):25-32.
- Mitchison, T.J., and L.P. Cramer. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell.* 84:371-9.
- Moazzam, F., F.A. DeLano, B.W. Zweifach, and G.W. Schmid-Schonbein. 1997. The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5338-43.
- Moens, P.B. 1976. Spindle and kinetochore morphology of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol.* 68:113-22.
- Mogilner, A., and G. Oster. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J.* 71:3030-45.
- Moores, S.L., J.H. Sabry, and J.A. Spudich. 1996. Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:443-6.
- Moores, S.L., and J.A. Spudich. 1998. Conditional loss-of-myosin-II-function mutants reveal a position in the tail that is critical for filament nucleation. *Mol Cell.* 1:1043-50.
- Morrison, A., and A. Harwood. 1992. A simple method of generating axenic derivatives of *Dictyostelium* strains. *Exp Cell Res.* 199:383-6.
- Mui, B.L., H.G. Dobereiner, T.D. Madden, and P.R. Cullis. 1995. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys J.* 69:930-41.
- Mukhopadhyay, R., G.H.W. Lim, and M. Wortis. 2002. Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing. *Biophys. J.* 82:1756–1772.
- Muller, K., and G. Gerisch. 1978. A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium* cells. *Nature.* 274:445-9.
- Mullins, R.D. 2000. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol.* 12:91-6.
- Mullins, R.D., W.F. Stafford, and T.D. Pollard. 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* 136:331-43.
- Nauli, S.M., F.J. Alenghat, Y. Luo, E. Williams, P. Vassilev, X. Li, A.E. Elia, W. Lu, E.M. Brown, S.J. Quinn, D.E. Ingber, and J. Zhou. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 33:129-37.
- Needham, D., and E. Evans. 1988. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20 degrees C below to 10 degrees C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24 degrees C. *Biochemistry.* 27:8261-9.
- Nellen, W., C. Silan, and R.A. Firtel. 1984. DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol.* 4:2890-8.
- Nerem, R.M. 1992. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. *J Biomech Eng.* 114:274-82.
- Neujahr, R., R. Albrecht, J. Kohler, M. Matzner, J.M. Schwartz, M. Westphal, and G. Gerisch. 1998. Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 9):1227-40.
- Neujahr, R., C. Heizer, and G. Gerisch. 1997. Myosin II-independent processes in mitotic cells of *Dictyostelium discoideum*: redistribution of the nuclei, re-arrangement of the actin system and formation of the cleavage furrow. *J Cell Sci.* 110 (Pt 2):123-37.
- Niewohner, J., I. Weber, M. Maniak, A. Muller-Taubenberger, and G. Gerisch. 1997. Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol.* 138:349-61.
- Normand, V., D.L. Lootens, E. Amici, K.P. Plucknett, and P. Aymard. 2000. New insight into agarose gel mechanical properties. *Biomacromolecules.* 1:730-8.

- North, M.J., and K.L. Williams. 1978. Relationship between the axenic phenotype and sensitivity to omega-aminocarboxylic acids in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 107:223-230.
- Numaguchi, K., S. Eguchi, T. Yamakawa, E.D. Motley, and T. Inagami. 1999. Mechanotransduction of rat aortic vascular smooth muscle cells requires RhoA and intact actin filaments. *Circ Res.* 85:5-11.
- O'Hagan, R., and M. Chalfie. 2005. Mechanosensation in *Caenorhabditis elegans*. *Int Rev Neurobiol.* 69:169-203.
- Olbrich, K., W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans. 2000. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J.* 79:321-7.
- Olesen, S.P., D.E. Clapham, and P.F. Davies. 1988. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature.* 331:168-70.
- Ormo, M., A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273:1392-5.
- Ott, A., F. Oehme, H. Keller, and S.C. Schuster. 2000. Osmotic stress response in *Dictyostelium* is mediated by cAMP. *Embo J.* 19:5782-92.
- Owens, N.F., D. Gingell, and J. Bailey. 1988. Contact-mediated triggering of lamella formation by *Dictyostelium* amoebae on solid surfaces. *J Cell Sci.* 91 (Pt 3):367-77.
- Palecek, S.P., J.C. Loftus, M.H. Ginsberg, D.A. Lauffenburger, and A.F. Horwitz. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature.* 385:537-40.
- Pantaloni, D., and M.F. Carlier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75:1007-14.
- Parent, C.A. 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr Opin Cell Biol.* 16:4-13.
- Parent, C.A., B.J. Blacklock, W.M. Froehlich, D.B. Murphy, and P.N. Devreotes. 1998. G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell.* 95:81-91.
- Parent, C.A., and P.N. Devreotes. 1999. A cell's sense of direction. *Science.* 284:765-70.
- Pasternak, C., P.F. Flicker, S. Ravid, and J.A. Spudich. 1989a. Intermolecular versus intramolecular interactions of *Dictyostelium* myosin: possible regulation by heavy chain phosphorylation. *J Cell Biol.* 109:203-10.
- Pasternak, C., J.A. Spudich, and E.L. Elson. 1989b. Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin. *Nature.* 341:549-51.
- Pelham, R.J., Jr., and Y. Wang. 1999. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell.* 10:935-45.
- Péré, J.-P. 1994. La microscopie. *Sciences 128, Nathan Université, Paris.*
- Pierres, A., A.M. Benoliel, P. Bongrand, and P.A. van der Merwe. 1996. Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached CD2 and CD48 adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:15114-8.
- Pignataro, B., C. Steinem, H.J. Galla, H. Fuchs, and A. Janshoff. 2000. Specific adhesion of vesicles monitored by scanning force microscopy and quartz crystal microbalance. *Biophys J.* 78:487-98.
- Pincet, F., T. Le Bouar, Y. Zhang, J. Esnault, J.M. Mallet, E. Perez, and P. Sinay. 2001. Ultraweak sugar-sugar interactions for transient cell adhesion. *Biophys J.* 80:1354-8.
- Podolski, J.L., and T.L. Steck. 1990. Length distribution of F-actin in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 265:1312-8.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2001. Actin dynamics. *J Cell Sci.* 114:3-4.

- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Ponder, E. 1948. Hemolysis and Related Phenomena. *Grune and Stratton, New York*.
- Postma, M., L. Bosgraaf, H.M. Looovers, and P.J. Van Haastert. 2004a. Chemotaxis: signalling modules join hands at front and tail. *EMBO Rep*. 5:35-40.
- Postma, M., J. Roelofs, J. Goedhart, H.M. Looovers, A.J. Visser, and P.J. Van Haastert. 2004b. Sensitization of Dictyostelium chemotaxis by phosphoinositide-3-kinase-mediated self-organizing signalling patches. *J Cell Sci*. 117:2925-35.
- Potma, E.O., W.P. de Boeij, L. Bosgraaf, J. Roelofs, P.J. van Haastert, and D.A. Wiersma. 2001. Reduced protein diffusion rate by cytoskeleton in vegetative and polarized dictyostelium cells. *Biophys J*. 81:2010-9.
- Prasher, D.C., V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, and M.J. Cormier. 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-33.
- Prassler, J., A. Murr, S. Stocker, J. Faix, J. Murphy, and G. Marriott. 1998. DdLIM is a cytoskeleton-associated protein involved in the protrusion of lamellipodia in Dictyostelium. *Mol Biol Cell*. 9:545-59.
- Qi, Z., A. Kishigami, Y. Nakagawa, H. Iida, and M. Sokabe. 2004. A mechanosensitive anion channel in Arabidopsis thaliana mesophyll cells. *Plant Cell Physiol*. 45(11):1704-8.
- Radler, J.O., T.J. Feder, H.H. Strey, and E. Sackmann. 1995. Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*. 51:4526-4536.
- Rainger, G.E., C.D. Buckley, D.L. Simmons, and G.B. Nash. 1999. Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through alphaVbeta3-integrin. *Am J Physiol*. 276:H858-64.
- Raucher, D., and M.P. Sheetz. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*. 148:127-36.
- Rhoads, D.S., S.M. Nadkarni, L. Song, C. Voeltz, E. Bodenschatz, and J.L. Guan. 2005. Using microfluidic channel networks to generate gradients for studying cell migration. *Methods Mol Biol*. 294:347-57.
- Rickert, P., O.D. Weiner, F. Wang, H.R. Bourne, and G. Servant. 2000. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol*. 10:466-73.
- Rieu, J.P., C. Barentin, Y. Maeda, and Y. Sawada. 2005. Direct mechanical force measurements during the migration of Dictyostelium slugs using flexible substrata. *Biophys J*. 89:3563-76.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*. 153:1175-86.
- Rivero, F., R. Furukawa, M. Fechheimer, and A.A. Noegel. 1999. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of Dictyostelium. *J Cell Sci*. 112 (Pt 16):2737-51.
- Robinson, D.N., G. Cavet, H.M. Warrick, and J.A. Spudich. 2002. Quantitation of the distribution and flux of myosin-II during cytokinesis. *BMC Cell Biol*. 3:4.
- Rochas, C., A.-M. Hecht, and E. Geissler. 1996. Swelling properties of agarose gels. *J Chem Phys*. 93:850-857.
- Rochas, C., A.-M. Hecht, F. Horkay, and E. Geissler. 1997. Anisotropic agarose gels. *Macromol. Symp*. 114:173-178.

- Rock, R.S., S.E. Rice, A.L. Wells, T.J. Purcell, J.A. Spudich, and H.L. Sweeney. 2001. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13655-9.
- Rubino, S., M. Fighetti, E. Unger, and P. Cappuccinelli. 1984. Location of actin, myosin, and microtubular structures during directed locomotion of *Dictyostelium amebae*. *J Cell Biol*. 98:382-90.
- Ruppel, K.M., M. Lorenz, and J.A. Spudich. 1995. Myosin structure/function: a combined mutagenesis-crystallography approach. *Curr Opin Struct Biol*. 5:181-6.
- Ruppel, K.M., and J.A. Spudich. 1995. Myosin motor function: structural and mutagenic approaches. *Curr Opin Cell Biol*. 7:89-93.
- Ruppel, K.M., T.Q. Uyeda, and J.A. Spudich. 1994. Role of highly conserved lysine 130 of myosin motor domain. In vivo and in vitro characterization of site specifically mutated myosin. *J Biol Chem*. 269:18773-80.
- Sachs, F., and C.E. Morris. 1998. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 132:1-77.
- Sackmann, E. 1995. Biological membranes, architecture and function (chap. 1) and Physical basis of self-organization and function of membranes: Physics of vesicles (chap. 5). In *Structure and Dynamics of Membranes, From Cells to Vesicles, vol.1A*. Ed. R. Lipowsky and E. Sackmann. Elsevier Science, Amsterdam.
- Sadoshima, J., and S. Izumo. 1997. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 59:551-71.
- Sandre, O. 2000. Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes. *PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, France*.
- Sandre, O., L. Moreaux, and F. Brochard-Wyart. 1999. Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10591-6.
- Sawada, Y., and M.P. Sheetz. 2002. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol*. 156:609-15.
- Schafer, D.A., and J.A. Cooper. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:497-518.
- Schafer, D.A., M.D. Welch, L.M. Machesky, P.C. Bridgman, S.M. Meyer, and J.A. Cooper. 1998. Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol*. 143:1919-30.
- Schindl, M., E. Wallraff, B. Deubzer, W. Witke, G. Gerisch, and E. Sackmann. 1995. Cell-substrate interactions and locomotion of *Dictyostelium* wild-type and mutants defective in three cytoskeletal proteins: a study using quantitative reflection interference contrast microscopy. *Biophys J*. 68:1177-90.
- Schleicher, M., and A.A. Noegel. 1992. Dynamics of the *Dictyostelium* cytoskeleton during chemotaxis. *New Biol*. 4:461-72.
- Schneider, N., I. Weber, J. Faix, J. Prassler, A. Muller-Taubenberger, J. Kohler, E. Burghardt, G. Gerisch, and G. Marriott. 2003. A Lim protein involved in the progression of cytokinesis and regulation of the mitotic spindle. *Cell Motil Cytoskeleton*. 56:130-9.
- Schroder, R.R., D.J. Manstein, W. Jahn, H. Holden, I. Rayment, K.C. Holmes, and J.A. Spudich. 1993. Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1. *Nature*. 364:171-4.
- Seifert, U., K. Berndl, and R. Lipowsky. 1991. Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models. *Physical Review A*. 44:1182-1202.
- Sellers, J.R., and H.V. Goodson. 1995. Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile*. 2:1323-1423.

- Sesaki, H., and S. Ogihara. 1997. Protrusion of cell surface coupled with single exocytotic events of secretion of the slime in *Physarum* plasmodia. *J Cell Sci.* 110 (Pt 7):809-18.
- Shay-Salit, A., M. Shushy, E. Wolfvitz, H. Yahav, F. Breviario, E. Dejana, and N. Resnick. 2002. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:9462-7.
- Sheetz, M.P., and S.J. Singer. 1974. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:4457-61.
- Shelden, E., and D.A. Knecht. 1995. Mutants lacking myosin II cannot resist forces generated during multicellular morphogenesis. *J Cell Sci.* 108 (Pt 3):1105-15.
- Shelden, E., and D.A. Knecht. 1996. Dictyostelium cell shape generation requires myosin II. *Cell Motil Cytoskeleton.* 35:59-67.
- Sheterline, P., and J.E. Rickard. 1989. The cortical actin filament network of neutrophil leucocytes during phagocytosis and chemotaxis. In *The Neutrophil: Cellular Biochemistry and Physiology.* M. B. Hallett, editor. CRC Press, Boca Raton, FL.:p141-165.
- Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 59:223-39.
- Shiu, Y.T., S. Li, W.A. Marganski, S. Usami, M.A. Schwartz, Y.L. Wang, M. Dembo, and S. Chien. 2004. Rho mediates the shear-enhancement of endothelial cell migration and traction force generation. *Biophys J.* 86:2558-65.
- Simson, R., E. Wallraff, J. Faix, J. Niewohner, G. Gerisch, and E. Sackmann. 1998. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of *Dictyostelium* lacking talin or cortexillins. *Biophys J.* 74:514-22.
- Small, D.L., and C.E. Morris. 1994. Delayed activation of single mechanosensitive channels in *Lymnaea* neurons. *Am J Physiol.* 267:C598-606.
- Small, J.V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* 15:40-7.
- Soldati, T. 2003. Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic.* 4:358-66.
- Spudich, J.A. 1994. How molecular motors work. *Nature.* 372:515-8.
- Spudich, J.A., S.J. Kron, and M.P. Sheetz. 1985. Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin. *Nature.* 315:584-6.
- Stauch, O., T. Uhlmann, M. Frohlich, R. Thomann, M. El-Badry, Y.K. Kim, and R. Schubert. 2002. Mimicking a cytoskeleton by coupling poly(N-isopropylacrylamide) to the inner leaflet of liposomal membranes: effects of photopolymerization on vesicle shape and polymer architecture. *Biomacromolecules.* 3:324-32.
- Sten-Knudsen, O. 1978. Passive transport processes. In: *Giebisch G, Tosteson DC, Ussing HH, eds. Membrane Transport in Biology. I. Concepts and Models.* Springer, New-York pp1-113.
- Stockbridge, L.L., and A.S. French. 1988. Stretch-activated cation channels in human fibroblasts. *Biophys J.* 54:187-90.
- Stryer, L. 1995. Biochemistry, 4th edition. *W.H. Freeman and Company, New York, New York and Basingstoke.*
- Sukumaran, S., and U. Seifert. 2001. Influence of shear flow on vesicles near a wall: A numerical study. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 64:011916.
- Sussman, R., and M. Sussman. 1967. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem Biophys Res Commun.* 29:53-5.

- Svetina, S., A. Ottova-Leitmannova, and R. Glaser. 1982. Membrane bending energy in relation to bilayer couples concept of red blood cell shape transformations. *J Theor Biol.* 94:13-23.
- Svetina, S., and B. Zeks. 1989. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur Biophys J.* 17:101-11.
- Szent-Gyorgyi, A. 1945. Studies on muscle. *Acta Physiol Scandinav* 9(suppl. 25)
- Tamada, M., M.P. Sheetz, and Y. Sawada. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell.* 7:709-18.
- Tanaka, T., and D.J. Fillmore. 1979. Kinetics of swelling of gels. *J Chem Phys.* 70(3):1214-1218.
- Tanaka, T., L.O. Hocker, and G.B. Benedek. 1973. Spectrum of light scattered from a viscoelastic gel. *J Chem Phys.* 59(9):5151-5159.
- Taupin, C., M. Dvolaitzky, and C. Sauterey. 1975. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 14:4771-5.
- Taylor, B.L., I.B. Zhulin, and M.S. Johnson. 1999. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 53:103-28.
- Tekle, E., R.D. Astumian, W.A. Friauf, and P.B. Chock. 2001. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys J.* 81:960-8.
- Theriot, J.A. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol.* 136:1165-8.
- 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.* 357:257-60.
- Thilo, L., and G. Vogel. 1980. Kinetics of membrane internalization and recycling during pinocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:1015-9.
- Tilney, L.G., and D.A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 109:1597-608.
- Todd, I., J.S. Mellor, and D. Gingell. 1988. Mapping cell-glass contacts of *Dictyostelium* amoebae by total internal reflection aqueous fluorescence overcomes a basic ambiguity of interference reflection microscopy. *J Cell Sci.* 89 (Pt 1):107-14.
- Toyoshima, Y.Y., S.J. Kron, E.M. McNally, K.R. Niebling, C. Toyoshima, and J.A. Spudich. 1987. Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature.* 328:536-9.
- Toyoshima, Y.Y., C. Toyoshima, and J.A. Spudich. 1989. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads. *Nature.* 341:154-6.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Tsujioka, M., K. Yoshida, and K. Inouye. 2004. Talin B is required for force transmission in morphogenesis of *Dictyostelium*. *Embo J.* 23:2216-25.
- Turchetti, V., C. De Matteis, F. Leoncini, L. Trabalzini, M. Guerrini, and S. Forconi. 1997. Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clin Hemorheol Microcirc.* 17:209-15.
- Uchida, K.S., T. Kitanishi-Yumura, and S. Yumura. 2003. Myosin II contributes to the posterior contraction and the anterior extension during the retraction phase in migrating *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci.* 116:51-60.
- Uchida, K.S., and S. Yumura. 2004. Dynamics of novel feet of *Dictyostelium* cells during migration. *J Cell Sci.* 117:1443-55.
- Ueda, M., R. Graf, H.K. MacWilliams, M. Schliwa, and U. Euteneuer. 1997. Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9674-8.

- Ueda, M., and S. Ogihara. 1994. Microtubules are required in amoeba chemotaxis for preferential stabilization of appropriate pseudopods. *J Cell Sci.* 107 (Pt 8):2071-9.
- Uyeda, T.Q., S.J. Kron, and J.A. Spudich. 1990. Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin. *J Mol Biol.* 214:699-710.
- Uyeda, T.Q., H.M. Warrick, S.J. Kron, and J.A. Spudich. 1991. Quantized velocities at low myosin densities in an in vitro motility assay. *Nature.* 352:307-11.
- van Oudenaarden, A., and J.A. Theriot. 1999. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol.* 1:493-9.
- Verkhovsky, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol.* 9:11-20.
- Viallat, A., J. Dalous, and M. Abkarian. 2004. Giant lipid vesicles filled with a gel: shape instability induced by osmotic shrinkage. *Biophys J.* 86:2179-87.
- Vogel, G., L. Thilo, H. Schwarz, and R. Steinhart. 1980. Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol.* 86:456-65.
- Walker, R.G., A.T. Willingham, and C.S. Zuker. 2000. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science.* 287:2229-2234.
- Wang, J., L. Hou, D. Awrey, W.F. Loomis, R.A. Firtel, and C.H. Siu. 2000. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the lagC gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium* development. *Dev Biol.* 227:734-45.
- Wang, N., J.P. Butler, and D.E. Ingber. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260:1124-7.
- Wang, Y., E.L. Botvinick, Y. Zhao, M.W. Berns, S. Usami, R.Y. Tsien, and S. Chien. 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature.* 434:1040-5.
- Warrick, H.M., A. De Lozanne, L.A. Leinwand, and J.A. Spudich. 1986. Conserved protein domains in a myosin heavy chain gene from *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:9433-7.
- Wattenbarger, M.R., D.J. Graves, and D.A. Lauffenburger. 1990. Specific adhesion of glycophorin liposomes to a lectin surface in shear flow. *Biophys J.* 57:765-77.
- Watts, D.J., and J.M. Ashworth. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J.* 119:171-4.
- Waugh, R.E. 1996. Elastic energy of curvature-driven bump formation on red blood cell membrane. *Biophys J.* 70:1027-1035.
- Weber, I., J. Niewohner, A. Du, U. Rohrig, and G. Gerisch. 2002. A talin fragment as an actin trap visualizing actin flow in chemotaxis, endocytosis, and cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 53:136-49.
- Weber, I., E. Wallraff, R. Albrecht, and G. Gerisch. 1995. Motility and substratum adhesion of *Dictyostelium* wild-type and cytoskeletal mutant cells: a study by RICM/bright-field double-view image analysis. *J Cell Sci.* 108 (Pt 4):1519-30.
- Weiner, O.D. 2002. Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol.* 14:196-202.
- Welch, M.D., A.H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol.* 138:375-84.
- Welch, M.D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D.A. Portnoy, and T.J. Mitchison. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science.* 281:105-8.

- Wessels, D., D.R. Soll, D. Knecht, W.F. Loomis, A. De Lozanne, and J. Spudich. 1988. Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium amebae* lacking myosin heavy chain. *Dev Biol.* 128:164-77.
- Westphal, M., A. Jungbluth, M. Heidecker, B. Muhlbauer, C. Heizer, J.M. Schwartz, G. Marriott, and G. Gerisch. 1997. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol.* 7:176-83.
- Wiesner, S., E. Helfer, D. Didry, G. Ducouret, F. Lafuma, M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 2003. A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol.* 160:387-98.
- Williams, K.L. 1978. Characterization of dominant resistance to cobalt chloride in *Dictyostelium discoideum* and its use in parasexual genetic analysis. *Genetics.* 90:37-47.
- Williams, K.L., R.H. Kessin, and P.C. Newell. 1974. Parasexual genetics in *Dictyostelium discoideum*: Mitotic analysis of acriflavin resistance and growth in axenic medium. *J. Gen. Microbiol.* 84:59-69.
- Winegar, B.D., C.M. Haws, and J.B. Lansman. 1996. Subconductance block of single mechanosensitive ion channels in skeletal muscle fibers by aminoglycoside antibiotics. *J Gen Physiol.* 107:433-43.
- Wintz, W., H.-G. Döbereiner, and U. Seifert. 1996. Starfish vesicles. *Europhys. Lett.* 33 (5):403-408
- Wong, E.F., S.K. Brar, H. Sesaki, C. Yang, and C.H. Siu. 1996. Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 271:16399-408.
- Wong, P. 1999. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. *J Theor Biol.* 196(3):343-61.
- Wortis, M., U. Seifert, K. Berndl, B. Fourcade, L. Miao, M. Rao, and R.K.P. Zia. 1993. *In Proceedings of the Workshop on Dynamical Phenomena at Interfaces, Surfaces and Membranes, edited by D. Beysens, N. Boccara and G. Forgacs (Nova, New-York, 1993), pp. 221-236.*
- Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison, and H.R. Bourne. 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* 114:201-14.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33:103-19.
- Yap, B., and R.D. Kamm. 2005. Mechanical deformation of neutrophils into narrow channels induces pseudopod projection and changes in biomechanical properties. *J Appl Physiol.* 98:1930-9.
- Yumura, S. 1993. Reorganization of actin and myosin II in *Dictyostelium amoeba* during stimulation by cAMP. *Cell Struct Funct.* 18:379-88.
- Yumura, S. 1994. Rapid translocation of myosin II in vegetative *Dictyostelium amoebae* during chemotactic stimulation by folic acid. *Cell Struct Funct.* 19:143-51.
- Yumura, S., and Y. Fukui. 1998. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 111 (Pt 15):2097-108.
- Yumura, S., and T. Kitanishi-Yumura. 1990. Fluorescence-mediated visualization of actin and myosin filaments in the contractile membrane-cytoskeleton complex of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Struct Funct.* 15:355-64.
- Yumura, S., H. Mori, and Y. Fukui. 1984. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* 99:894-9.

- Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 296:913-6.
- Zernike, F. 1942a. *Physica*. 9:686.
- Zernike, F. 1942b. *Physica*. 9:974.
- Zhang, Y., and O.P. Hamill. 2000a. Calcium-, voltage- and osmotic stress-sensitive currents in *Xenopus* oocytes and their relationship to single mechanically gated channels. *J Physiol*. 523 Pt 1:83-99.
- Zhang, Y., and O.P. Hamill. 2000b. On the discrepancy between whole-cell and membrane patch mechanosensitivity in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 523 Pt 1:101-15.
- Zhou, X.L., M.A. Stumpf, H.C. Hoch, and C. Kung. 1991. A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science*. 253:1415-7.
- Zigmond, S.H. 1996. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*. 8:66-73.
- Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16:99-105.
- Zischka, H., F. Oehme, T. Pintsch, A. Ott, H. Keller, J. Kellermann, and S.C. Schuster. 1999. Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *Embo J*. 18:4241-9.
- Zolotukhin, S., M. Potter, W.W. Hauswirth, J. Guy, and N. Muzyczka. 1996. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol*. 70:4646-54.

ANNEXE

List of publications

Decave E, Rieu D, **Dalous J**, Fache S, Brechet Y, Fourcade B, Satre M, Bruckert F, 2003. Shear flow-induced motility of *Dictyostelium discoideum* cells on solid substrate. *J Cell Sci.* 116:4331-43.

Gebbie L, Benghezal M, Cornillon S, Froquet R, Cherix N, Malbouyres M, Lefkir Y, Grangeasse C, Fache S, **Dalous J**, Bruckert F, Letourneur F, Cosson P, 2004. Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* 15(8):3915-25.

Viallat A, **Dalous J**, Abkarian M, 2004. Giant lipid vesicles filled with a gel: shape instability induced by osmotic shrinkage. *Biophys J.* 86(4):2179-87.

Fache S, **Dalous J**, Engelung M, Hansen C, Chamaraux F, Fourcade B, Satre M, Devreotes P, Bruckert F, 2005. Calcium mobilization stimulates *Dictyostelium discoideum* shear-flow induced cell motility. *J Cell Sci.* 118:3445_3457.

Dalous J, Burghardt E, Müller-Taubenberger A, Bruckert F, Gerisch G, Bretschneider T. Reversal of cell polarity and actin cytoskeleton reorganization induced by mechanical and chemical stimulations. *In preparation.*

Etzrodt M, Ishikawa HCF, **Dalous J**, Müller-Taubenberger A, Bretschneider T, Gerisch G, 2006. Time-resolved responses to chemoattractant, characteristic of the front and tail of *Dictyostelium* cells. *FEBS Lett.* 580:6707-6713.

Résumé

Durant ce travail, deux approches ont été explorées.

Dans la première, j'ai quantifié le dégonflement osmotique de liposomes remplis d'un gel d'agarose. La fabrication de tels systèmes reconstitués vise à permettre de mimer le comportement de cellules soumises aux mêmes contraintes. En particulier, j'ai observé que ces liposomes fonctionnalisés acquièrent des morphologies crénelées lors de leur dégonflement pour une concentration du gel comprise entre 0.07 et 0.18 % en masse. Ces formes originales ressemblent à celles d'échinocytes parfois prises par les globules rouges. Le gel est responsable de l'apparition de ces formes, ne modifie pas les cinétiques de dégonflement mais sa pression élastique arrête précocement le dégonflement comparativement aux liposomes aqueux, mettant en évidence un phénomène de rétention d'eau.

Dans la deuxième approche, j'ai étudié l'effet de contraintes hydrodynamiques sur des amibes *Dictyostelium* adhérentes à un substrat et ai quantifié la réorganisation mécanosensible du cytosquelette de ces cellules vivantes. Pour obtenir les cinétiques de relocalisation de protéines majeures du cytosquelette en réponse aux forces d'un flux, j'ai marqué l'actine et la myosine-II avec des protéines fluorescentes et ai fabriqué une chambre à flux permettant de changer rapidement la direction du flux. Les cellules étudiées s'orientent contre les forces du flux et se réorientent contre en inversant leur polarité après une inversion du flux : d'abord l'actine dépolymérise puis des protrusions sont émises contre les nouvelles forces mécaniques, et 15 sec plus tard, l'arrière rétracte en utilisant la myo-II. La contractilité du système actine-myosine n'est pas nécessaire pour sentir les forces. La polymérisation d'actine est forte dès le contact avec le substrat. Nos expériences montrent que les contraintes de cisaillement au niveau de l'aire de contact cellule-substrat contrôlent les cycles de polymérisation-dépolymérisation de l'actine et de la myo-II. Les outils de visualisation que j'ai développés permettent d'étudier le rôle de protéines et de structures cellulaires dans la mécanotransduction.

Mots-clés : liposomes, gel d'agarose, dégonflement, choc osmotique, échinocytes / cellules *Dictyostelium discoideum*, contraintes hydrodynamiques de cisaillement, chambre à flux, réorganisation du cytosquelette, actine, myosine-II, protéines fluorescentes (GFP, mRFP), microscopie confocale, analyse d'images avec contours actifs, chimiotactisme, mécanosensibilité

Abstract

In this work, 2 approaches were explored.

First, I quantified the osmotic deswelling of liposomes filled with an agarose gel. The production of such artificial systems aims at mimicking cell behavior under the same constraints. Particularly, I observed that these functionalized liposomes with a gel concentration between 0.07 and 0.18% w/w adopted crenated morphologies when strongly deswelled. These original shapes look like the ones of echinocytes sometimes seen with red blood cells. The gel is responsible for these shapes, does not affect deswelling kinetics but its elastic pressure stops more rapidly the osmotic deswelling compared to aqueous liposomes. This brings evidence for a water retention effect.

In a second approach, I studied the effect of hydrodynamical constraints on *Dictyostelium* amoebae adhering to a substrate. I quantified the mechanosensitive reorganization of the cytoskeleton of these living cells. To get relocalization kinetics of major cytoskeleton proteins in response to flow forces, I labeled actin and myosin-II with fluorescent proteins (GFP/mRFP) and designed a flow chamber enabling to rapidly change the flow direction. Cells orient against flow forces and after a flow reversal reorient against new forces by inverting their polarity: first, actin depolymerizes, then actin rich protrusions are emitted against new mechanical forces and 15 sec later, the rear edge retracts with a myo-II crescent. The actin-myosin contractility is dispensable to sense forces. Actin polymerization is already strong at the cell-substrate contact. Our experiments show that shear constraints at the cell-substrate contact control polymerization-depolymerization cycles of actin and myo-II. The visualization tools that I developed enable to study the role of proteins and cellular structures in mechanotransduction.

Keywords : liposomes, agarose gel, deswelling, osmotic shock, echinocytes / *Dictyostelium discoideum* cells, shear flow, flow chamber, cytoskeleton reorganization, actin, myosin-II, fluorescent proteins (GFP, mRFP), laser scanning confocal microscopy, image analysis, active contours, chemotaxis, mechanosensitivity

Résumé

Durant ce travail, deux approches ont été explorées.

Dans la première, j'ai quantifié le dégonflement osmotique de liposomes remplis d'un gel d'agarose. La fabrication de tels systèmes reconstitués vise à permettre de mimer le comportement de cellules soumises aux mêmes contraintes. En particulier, j'ai observé que ces liposomes fonctionnalisés acquièrent des morphologies crénelées lors de leur dégonflement pour une concentration du gel comprise entre 0.07 et 0.18 % en masse. Ces formes originales ressemblent à celles d'échinocytes parfois prises par les globules rouges. Le gel est responsable de l'apparition de ces formes, ne modifie pas les cinétiques de dégonflement mais sa pression élastique arrête précocement le dégonflement comparativement aux liposomes aqueux, mettant en évidence un phénomène de rétention d'eau.

Dans la deuxième approche, j'ai étudié l'effet de contraintes hydrodynamiques sur des amibes *Dictyostelium* adhérentes à un substrat et ai quantifié la réorganisation mécanosensible du cytosquelette de ces cellules vivantes. Pour obtenir les cinétiques de relocalisation de protéines majeures du cytosquelette en réponse aux forces d'un flux, j'ai marqué l'actine et la myosine-II avec des protéines fluorescentes et ai fabriqué une chambre à flux permettant de changer rapidement la direction du flux. Les cellules étudiées s'orientent contre les forces du flux et se réorientent contre en inversant leur polarité après une inversion du flux : d'abord l'actine dépolymérise puis des protrusions sont émises contre les nouvelles forces mécaniques, et 15 sec plus tard, l'arrière rétracte en utilisant la myo-II. La contractilité du système actine-myosine n'est pas nécessaire pour sentir les forces. La polymérisation d'actine est forte dès le contact avec le substrat. Nos expériences montrent que les contraintes de cisaillement au niveau de l'aire de contact cellule-substrat contrôlent les cycles de polymérisation-dépolymérisation de l'actine et de la myo-II. Les outils de visualisation que j'ai développés permettent d'étudier le rôle de protéines et de structures cellulaires dans la mécanotransduction.

Mots-clés : liposomes, gel d'agarose, dégonflement, choc osmotique, échinocytes / cellules *Dictyostelium discoideum*, contraintes hydrodynamiques de cisaillement, chambre à flux, réorganisation du cytosquelette, actine, myosine-II, protéines fluorescentes (GFP, mRFP), microscopie confocale, analyse d'images avec contours actifs, chimiotactisme, mécanosensibilité

Abstract

In this work, 2 approaches were explored.

First, I quantified the osmotic deswelling of liposomes filled with an agarose gel. The production of such artificial systems aims at mimicking cell behavior under the same constraints. Particularly, I observed that these functionalized liposomes with a gel concentration between 0.07 and 0.18% w/w adopted crenated morphologies when strongly deswelled. These original shapes look like the ones of echinocytes sometimes seen with red blood cells. The gel is responsible for these shapes, does not affect deswelling kinetics but its elastic pressure stops more rapidly the osmotic deswelling compared to aqueous liposomes. This brings evidence for a water retention effect.

In a second approach, I studied the effect of hydrodynamical constraints on *Dictyostelium* amoebae adhering to a substrate. I quantified the mechanosensitive reorganization of the cytoskeleton of these living cells. To get relocalization kinetics of major cytoskeleton proteins in response to flow forces, I labeled actin and myosin-II with fluorescent proteins (GFP/mRFP) and designed a flow chamber enabling to rapidly change the flow direction. Cells orient against flow forces and after a flow reversal reorient against new forces by inverting their polarity: first, actin depolymerizes, then actin rich protrusions are emitted against new mechanical forces and 15 sec later, the rear edge retracts with a myo-II crescent. The actin-myosin contractility is dispensable to sense forces. Actin polymerization is already strong at the cell-substrate contact. Our experiments show that shear constraints at the cell-substrate contact control polymerization-depolymerization cycles of actin and myo-II. The visualization tools that I developed enable to study the role of proteins and cellular structures in mechanotransduction.

Keywords : liposomes, agarose gel, deswelling, osmotic shock, echinocytes / *Dictyostelium discoideum* cells, shear flow, flow chamber, cytoskeleton reorganization, actin, myosin-II, fluorescent proteins (GFP, mRFP), laser scanning confocal microscopy, image analysis, active contours, chemotaxis, mechanosensitivity