Etalement de Dictyostelium discoideum et rôle des protéines Phg2, PKD2 et TPC dans la motilité.

Sébastien Keller

▶ **To cite this version:**

Sébastien Keller. Etalement de Dictyostelium discoideum et rôle des protéines Phg2, PKD2 et TPC dans la motilité.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00193002

HAL Id: tel-00193002
https://theses.hal.science/tel-00193002

Submitted on 30 Nov 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

Sébastien KELLER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

Discipline : Biologie Cellulaire

présentée et soutenue publiquement le

18 Octobre 2007

Etalement de *Dictyostelium discoideum* et rôle des protéines Phg2, PKD2 et TPC dans la motilité

JURY :	**Michel Robert-Nicoud**	**Président**
	Patricia Rousselle	**Rapporteur**
	François Amblard	**Rapporteur**
	Michel De Waard	**Examinateur**
	Franz Bruckert	**Directeur de thèse**

TABLE DES MATIERES

1 INTRODUCTION 5

1.1 L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM 6

1.1.1 Dictyostelium discoideum comme modèle d'étude 6

1.1.2 Motilité cellulaire de Dictyostelium discoideum 9

1.2 MECANISMES MOLECULAIRES DE LA MOTILITE CELLULAIRE : LE CYTOSQUELETTE 10

1.2.1 Les filaments d'actine 10

1.2.2 Polymérisation d'actine et protrusions au front avant de la cellule 13

1.2.3 Complexe actine/myosine II et rétractions au front arrière de la cellule 15

1.2.4 Molécules de l'Adhésion cellulaire 18

1.3 VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA POLARISATION CELLULAIRE ET LE CHIMIOTACTISME 21

1.4 MECANO-SENSIBILITE CELLULAIRE. 26

1.4.1 Exemples de cellules mécano-sensibles 27

1.4.2 Mécanismes moléculaires de la mécano-sensibilité 29

1.5 CAS DE *DICTYOSTELIUM* : MECANO-SENSIBILITE ET ROLE DU CALCIUM 36

1.6 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 39

2 MATERIELS ET METHODES 41

2.1 BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE 41

2.1.1 Souches utilisées 41

2.1.2 Plasmides et constructions utilisés 43

2.1.3 Sous-clonage 45

2.1.4 Techniques de biologie moléculaire 47

2.1.5 Modes de culture et milieu nutritif 48

2.1.6 Mesure de la concentration cellulaire 49

2.1.7 Préparation des cellules 50

2.2 TRAITEMENT DES SURFACES 50

2.3 MESURE DE LA CINETIQUE DE L'ETALEMENT CELLULAIRE ET DE LA DYNAMIQUE DES ZONES DE CONTACT 51

2.3.1 Protocole expérimental 51

2.3.2 RICM 53

2.3.3 Analyse statistique de l'étalement cellulaire 55

2.4 EXPERIENCES DE MOTILITE SOUS FLUX A FAIBLE GROSSISSEMENT : DETERMINATION STATISTIQUE DE LA VITESSE ET DE L'ORIENTATION DES CELLULES 59

2.4.1 Chambre à flux latéral à lame 59

2.4.2 Calcul de la contrainte appliquée aux cellules 61

2.4.3 Préparation des cellules et déroulement de l'expérience 62

2.4.4 Changement de milieu, utilisation du calcium et détermination de la concentration 62

2.4.5 Acquisition et traitement des images 63

2.4.6 Traitement des données, champ de vitesse et orientation des cellules 65

2.5 EXPERIENCES DE MOTILITE SOUS FLUX A FORT GROSSISSEMENT : ANALYSE DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE ET DE LA DYNAMIQUE DES ZONES DE CONTACT 65

2.5.1 Montage expérimental et déroulement de l'expérience 66
2.5.2 Acquisition et traitement des images 66
2.6 ADHERENCE CELLULAIRE 66
2.6.1 Chambre à flux radial, préparation des cellules et déroulement de l'expérience 67
2.6.2 Calcul de la contrainte appliquée aux cellules 69
2.6.3 Acquisition et traitement des images 70
2.6.4 Détermination de la contrainte seuil apparente de détachement 72

3 RESULTATS 73

3.1 ETALEMENT CELLULAIRE 73
3.1.1 Cinétique d'étalement de Dictyostelium discoideum. 73
3.1.2 Etude des protrusions et rétractions. Mise en évidence d'une activité périodique 80
3.1.3 Influence de la concentration en calcium sur l'activité périodique des protrusions et rétractions 87
3.1.4 Influence de l'adhérence cellule-substrat sur l'activité périodique des protrusions et rétractions 91
3.1.5 Polarisation de l'étalement 93
3.2 ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE PHG2 DANS LA MOTILITE CELLULAIRE. 100
3.2.1 Introduction 100
3.2.2 Rôle des différents domaines de Phg2 dans l'adhésion cellulaire 103
3.2.3 Rôle des différents domaines de Phg2 dans la motilité induite par un flux hydrodynamique 104
3.2.4 Rôle des différents domaines de Phg2 dans l'étalement cellulaire 108
3.3 ETUDE DE LA FONCTION DES PROTEINES PKD2 ET TPC DE *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*. 119
3.3.1 Invalidation de pkd2 et tpc et surexpression de GFP-PKD2 120
3.3.2 Rôle de PKD2 et TPC dans la croissance cellulaire et le développement. 123
3.3.3 Analyse de la motilité cellulaire sous contrainte hydrodynamique 126

4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES 131

4.1 CARACTERES GENERAUX DE L'ETALEMENT CELLULAIRE. 132
4.1.1 L'étalement est un processus quasi-linéaire. 134
4.1.2 Anisotropie de l'étalement et cellules phagocytaires 135
4.2 PHENOMENES OSCILLANTS, ETALEMENT ET MOTILITE 136
4.3 ROLE DU CALCIUM DANS L'ETALEMENT ET LA MOTILITE CELLULAIRE INDUITE PAR UN FLUX 140
4.4 ROLE DE PHG2 DANS L'ETALEMENT ET LA MOTILITE CELLULAIRE 142
4.4.1 Phg2 et la polarisation cellulaire 142
4.4.2 Les partenaires de Phg2 : Phg2 et la phosphorylation des myosines II 143
4.4.3 Rôle proposé pour les différents domaines de Phg2 148
4.5 PERSPECTIVES 150

5 BIBLIOGRAPHIE 151

6 ANNEXES : PUBLICATIONS 157

1 INTRODUCTION

La motilité cellulaire se définit comme la capacité d'une cellule à se déplacer de manière active, par opposition au terme de mobilité qui renvoie au simple fait qu'un objet se déplace ou reste immobile. La motilité cellulaire suppose donc la mise en place et la coordination par une cellule de divers mécanismes moléculaires en vue de se mouvoir.

La motilité cellulaire intervient chez de nombreuses espèces, des plus simples au plus évoluées. Les enjeux de cette capacité à se déplacer peuvent varier de cellules à cellules (recherche de nourriture pour des bactéries et des amibes, cicatrisation pour des fibroblastes ou kératocytes, lutte contre les pathogènes pour les neutrophiles…).

Différentes stratégies sont mises en place. Leur utilisation dépend du type de cellule et de leur environnement (déplacement en deux ou trois dimensions par exemple), et peut impliquer l'utilisation d'organes accessoires comme des cils ou des flagelles. Nous ne détaillerons pas ces différentes motilités, mais nous nous concentrerons sur une motilité de type neutrophile ou amibienne.

Les neutrophiles sont des cellules capables de se déplacer à l'intérieur des tissus pour y traquer d'éventuels pathogènes. Cette traque met en jeu la motilité dirigée par des molécules chimiques produites par les agents pathogènes, que l'on appelle chimiotactisme, et l'absorption des agents repérés par phagocytose (figure 1.1).

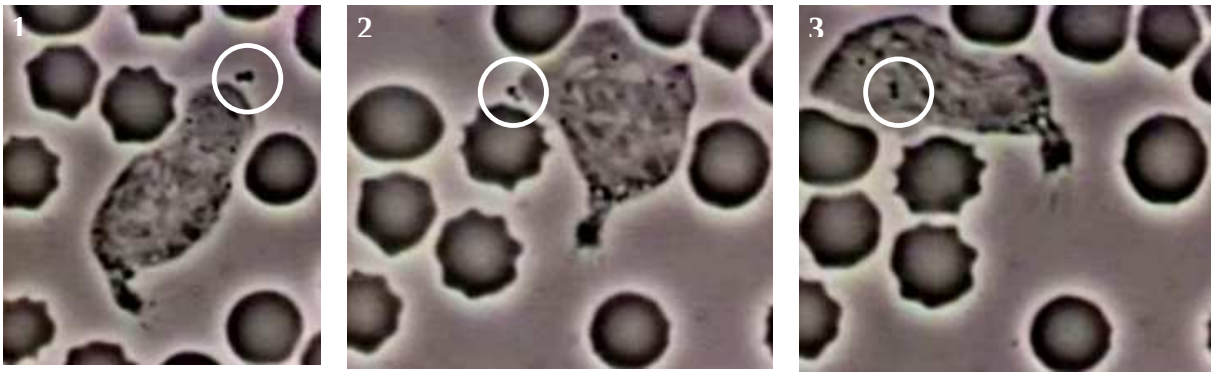


Fig 1.1 : Neutrophile repérant (1), poursuivant (2) et phagocytant (3) une bactérie (entourée en blanc). (Alberts et al., 2002)

Dictyostelium discoideum est un organisme unicellulaire motile dont le comportement ressemble à celui des neutrophiles. Au cours de ma thèse, j'ai choisi de m'intéresser à la motilité de cet organisme modèle. Dans un premier temps, je vais présenter cet organisme en insistant sur ses atouts en tant que modèle d'étude, puis je détaillerai les mécanismes moléculaires à l'origine du mouvement de ces cellules ainsi que les voies de signalisation les régulant. Je parlerai ensuite de la mécano-sensibilité de ces cellules et des expériences de motilité induite par un flux réalisées au laboratoire précédemment, avant de présenter les objectifs de ma thèse.

1.1 L'amibe Dictyostelium discoideum

1.1.1 *Dictyostelium discoideum* comme modèle d'étude

Dictyostelium discoideum est un organisme eucaryote unicellulaire découvert dans les années 1930 par Raper (Raper and Smith, 1939). Le génome de cette amibe, haploïde, a été entièrement séquencé (Eichinger et al., 2005). Il se compose de 34 Mégabases, réparties sur 6 chromosomes, et contient environ 12500 gènes. A titre de comparaison, c'est deux fois plus que la levure *Saccharomyses cerevisiae* (6000 gènes environ), et presque autant que certains organismes pluricellulaires comme *Drosophila melanogaster* (14000 gènes environ). Au niveau phylogénétique, *Dictyostelium discoideum* a divergé après la séparation plante/animaux, mais avant celle entre animaux et champignons (figure 1.2).
Néanmoins, du fait d'une évolution moins rapide, la distance entre *Dictyostelium* et l'homme est moindre que celle entre l'homme et la levure *S. cerevisiae*. En particulier, une trentaine de gènes orthologues à des gènes impliqués dans des maladies humaines ont été identifiés, dont 5 sont absents des génomes de levure *(Eichinger et al., 2005)*.

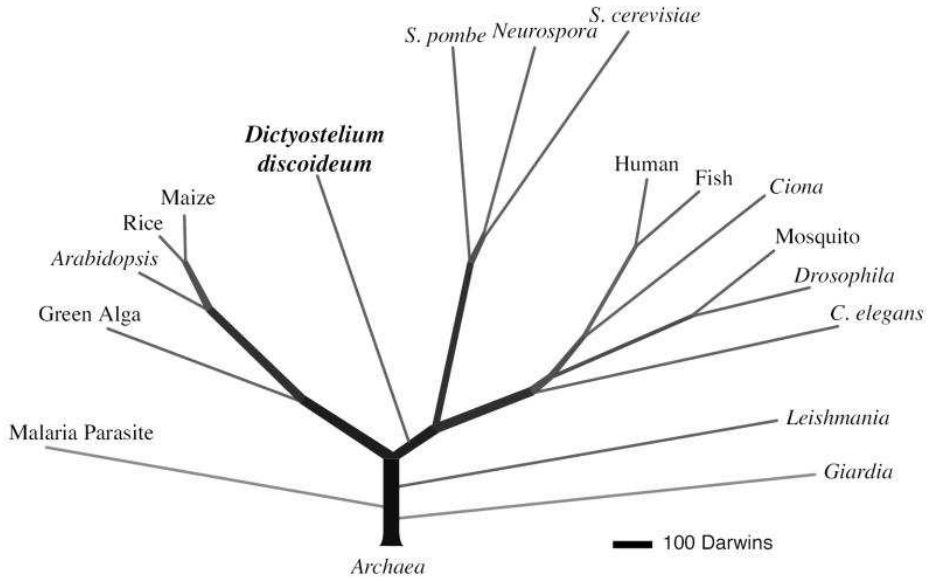


Fig 1.2 Arbre philogénétique réalisé à partir des protéomes de 17 organismes eucaryotes et de 6 archébactéries. La longueur relative des branches est donnée en Darwins (1 Darwin = 1/2000 de la divergence entre S. cerevisiae *et l'homme). (Eichinger et al., 2005)*

Dans la nature, *Dictyostelium discoideum* vit dans les sous-sols boisés en se nourrissant de bactéries par phagocytose. Les souches utilisées au laboratoire ont subi des mutations qui leur permettent également de se nourrir par macropinocytose de milieu axénique (ne contenant pas de bactéries) (Williams et al., 1974).

En présence de nutriments, *Dictyostelium* existe et se multiplie sous la forme de cellules isolées, d'environ 10µm de diamètre. Cette phase de croissance des cellules est dite phase végétative. En cas de carence nutritive, les cellules cessent de se diviser et s'engagent dans un processus de développement (figure 1.3, pour une revue voir (Coates and Harwood, 2001) ou (Aubry and Firtel, 1999)): les cellules produisent et relayent un signal d'AMPc, et se déplacent vers la source de ce signal par chimiotactisme. De cette manière, des agrégats de 10^5 cellules environ se forment entre 5 et 10 heures après le début de la carence. Chaque agrégat va ensuite évoluer pour former une structure allongée dite de limaçon, capable de se déplacer. Au sein de cette structure, les cellules se différencient en deux types distincts, des cellules dites pré-tiges (environ 25% des cellules) et pré-spores (environ 75% des cellules). Enfin, le limaçon va se relever pour former la fructification finale : une tige de cellules mortes surmontée d'un amas de cellules dites spores, très résistantes et susceptibles de redonner des cellules végétatives si les conditions nutritives redeviennent favorables.

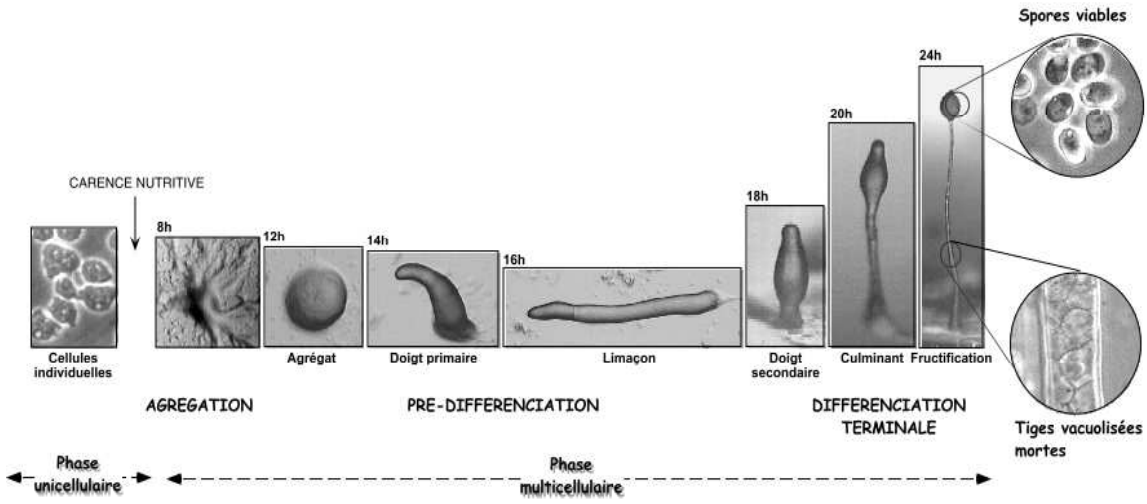


Figure 1.3 : Etapes du cycle de développement de Dictyostelium discoideum. (photos : Laurence Aubry)

Au cours de ces différents cycles de vie, l'amibe *Dictyostelium* est donc capable de se déplacer spontanément ou par chimiotactisme (vers l'acide folique en phase végétative et vers l'AMPc en phase agrégative), de phagocyter des particules, de se différentier en deux types cellulaires, et de former des structures organisées.

La manipulation de l'amibe est relativement simple (organisme non pathogène, croissance assez rapide avec un temps de doublement de 10 heures environ, température optimale de croissance de 21°C) et il existe de nombreux outils moléculaires pour inactiver ou surexprimer des gènes. Enfin, comme on l'a déjà évoqué, le génome est haploïde et désormais séquencé. *Dictyostelium* présente donc de nombreuses fonctions que l'on retrouve chez des eucaryotes plus évolués, mais a l'avantage d'être un organisme plus simple et plus aisément manipulable, ce qui en fait un bon modèle d'étude. D'ailleurs, *Dictyostelium discoideum* est reconnu par le NIH (National Institutes of Health, USA) comme modèle pour la recherche biomédicale depuis 1999.

Nous allons maintenant évoquer les mécanismes qui permettent à *Dictyostelium* de se mouvoir.

1.1.2 Motilité cellulaire de *Dictyostelium discoideum*

L'amibe *Dictyostelium discoideum* est capable de se déplacer sur une surface à une vitesse de l'ordre de 10µm/mn. Cette motilité dite amibienne peut être décomposée en un cycle comportant trois phases (figure 1.4) :

- **l'émission de protrusions au front avant de la cellule (a et b)**. C'est-à-dire une déformation de la membrane qui peut avoir des formes diverses. La cellule doit donc exercer des forces sur la membrane pour la déplacer. Ces forces sont obtenues grâce à la polymérisation de filaments d'actine.
- **l'adhésion de ces protrusions sur le substrat (c).** L'adhésion des protrusions sur le substrat permet d'exercer des forces pour tirer la cellule vers l'avant. L'adhésion cellulaire met en jeu de nombreux assemblages moléculaires, parmi lesquels des protéines de type intégrine.
- **le détachement et la rétraction du front arrière de la cellule (d et e).** Une fois la cellule bien étirée sur la surface, elle doit se contracter avant de pouvoir s'étendre à nouveau. Cette phase nécessite d'exercer des forces de contraction à l'arrière de la cellule. Elle met plus particulièrement en jeu des assemblages de myosine II et de filaments d'actine.

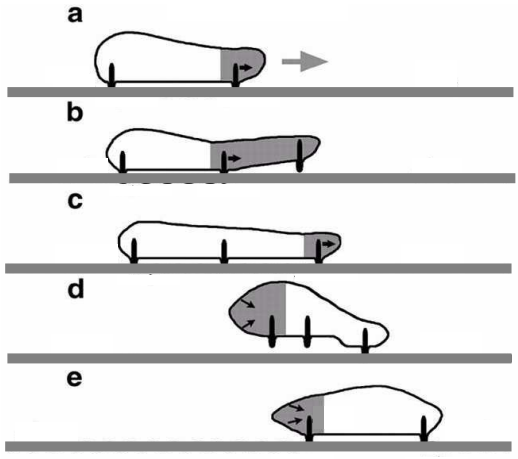


Fig 1.4 *: Modèle du cycle du mouvement cellulaire pour des cellules Dictyostelium. La flèche grise indique le sens du mouvement. En gris, les zones où la cellule exerce des forces (flèches noires) pour déformer sa membrane. Les points d'adhésion avec le substrat sont représentés en noir.*
d'après (Uchida et al., 2003)

Les trois phases ne sont pas indépendantes : la coordination temporelle et spatiale entre les différentes phases est un élément essentiel pour que la cellule avance correctement.

Pour se déplacer, la cellule doit être capable de pousser sa membrane à l'avant et de tirer celle-ci à l'arrière, et donc d'exercer des forces. L'existence de ces forces peut être mise en évidence en déposant les cellules sur un substrat déformable. (Uchida et al., 2003). Dans ce

qui suit, nous allons revenir sur l'origine moléculaire de ces différentes forces, puis nous nous intéresserons aux voies de signalisation qui régulent et coordonnent leurs actions.

1.2 Mécanismes moléculaires de la motilité cellulaire : le cytosquelette

Le cytosquelette est un élément essentiel pour la réponse mécanique des cellules. Comme son nom l'indique, c'est un vrai squelette interne de la cellule qui sert entre autres au transport d'organelles, à la division cellulaire et à la motilité cellulaire. Chez *Dictyostelium*, il est formé de deux types de protéines, formant deux réseaux de filaments :

- les microtubules, longs filaments assez rigides (longueur de persistance $L_p \approx 6mm$) sont composés de monomères de tubuline. Ces filaments sont principalement impliqués dans le maintien de la forme des cellules, dans le transport intracellulaire, et dans la division cellulaire. Ils ne semblent pas impliqués dans la motilité cellulaire, du moins dans la production de forces chez *Dictyostelium*, même s'ils pourraient jouer un rôle de stabilisation des protrusions (Ueda et al., 1997)
- les filaments d'actine, beaucoup plus souples ($L_p \approx 18\mu m$) sont formés à partir de monomères d'actine.

1.2.1 Les filaments d'actine

L'actine est une protéine de 375 acides aminés, de poids moléculaire 42 kDa, et dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution. C'est une des protéines les plus abondantes de la cellule, avec une concentration de l'ordre de 100µM dans le cytoplasme.

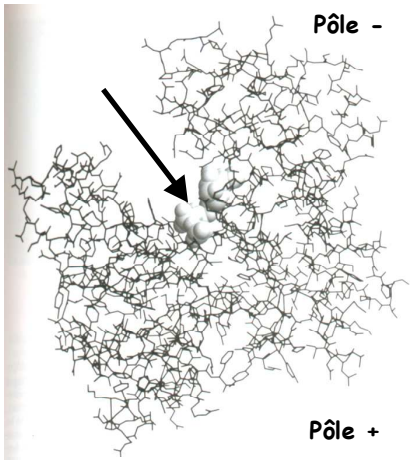


Fig 1.5 : *Modèle structural de l'actine-G. L'ATP (flèche) est fixé dans une crevasse située entre deux domaines. (d'après (Bray, 2001))*

La structure de l'actine est connue ((Kabsch et al., 1990), voir figure 1.5). La molécule a une forme globulaire, avec une cavité qui rend la protéine asymétrique. A l'intérieur de cette cavité se trouve un site de liaison à l'ATP/ADP.

Chaque molécule d'actine est capable de se lier à d'autres molécules d'actine pour former un polymère qui peut atteindre plusieurs µm de long. Le polymère obtenu a la forme d'un long filament ayant une structure en double hélice (figure 1.6). De plus, il est polarisé, du fait de la non-symétrie des monomères d'actine. En effet, chaque extrémité du filament exposant des résidus différents du monomère d'actine, les deux extrémités ont des propriétés différentes et interagissent avec des molécules différentes. On définit ainsi une extrémité +, dite « barbée » et une extrémité –, dite « pointée ». Pour distinguer l'actine sous forme monomérique de l'actine présente sous forme de filament, on parlera d'actine-G (pour globulaire) dans le cas du monomère libre et d'actine-F pour les filaments.

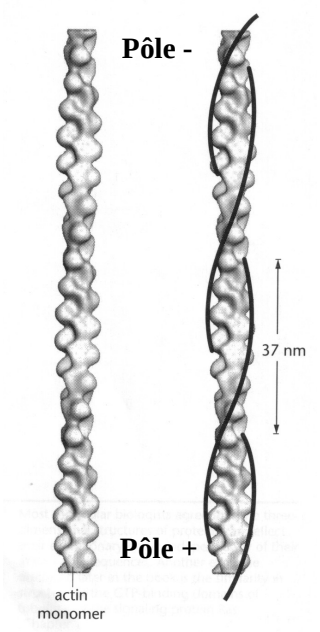


Fig 1.6 : Structure d'un filament d'actine. Les monomères sont associés en double hélice à brins parallèles. Chaque monomère est en contact avec quatre autres (Bamburg et al., 1999).

L'actine-G commence à polymériser spontanément si la concentration en monomère est supérieure à une concentration critique C_c. La valeur de C_c dépend du fait que le monomère d'actine soit lié à une molécule d'ATP ou à une molécule d'ADP (C_c de respectivement 0,12µM et 2,0µM). L'actine-G polymérise donc plus facilement lorsqu'elle est liée à l'ATP. La polymérisation se déroule alors en deux phases (figure 1.7) : une première étape, lente, dite phase de nucléation, pendant laquelle des monomères s'assemblent pour former des trimères d'actine. Une fois ces trimères formés, les filaments croissent rapidement par addition de monomères aux extrémités. C'est la phase d'élongation des filaments.

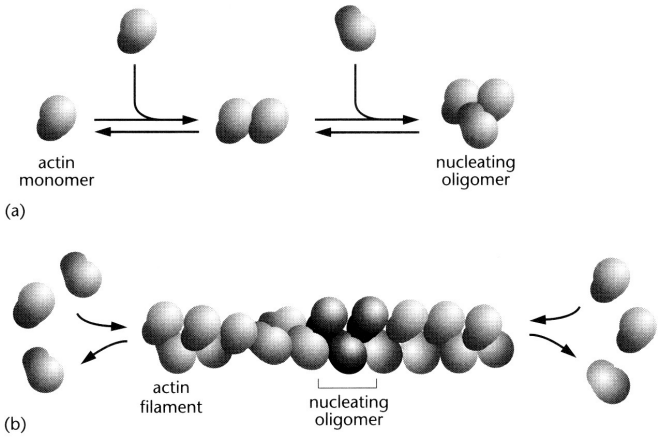


Fig 1.7 : *Les deux étapes de la polymérisation d'actine.* ***(a)*** *La première étape, la plus lente, est la formation d'un trimère par nucléation de l'actine-G.* ***(b)*** *Une fois ce trimère formé, les monomères s'associent et se dissocient pour former un filament (Bray, 2001).*

Une fois cette phase d'élongation enclenchée, le phénomène de polymérisation peut être décrit comme un équilibre dynamique entre association de monomères (qui dépend de la concentration en monomères libres), et dissociation de monomères. La vitesse de croissance d'un filament peut alors s'écrire :

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

A la concentration critique k_{off}/k_{on}, la polymérisation est en équilibre avec la dépolymérisation.

On a vu que les deux extrémités d'un filament n'étaient pas identiques. Cela se retrouve aussi au niveau des vitesses de croissance à chaque extrémité : L'extrémité barbée (+) croît plus vite que l'extrémité pointée (-) (Pollard and Borisy, 2003).

En résumé, on a une polymérisation préférentielle de l'actine-G liée à l'ATP à l'extrémité barbée du filament. Une fois polymérisé, l'ATP est rapidement hydrolysé en ADP. Et à l'extrémité pointée, les monomères d'actine liés à l'ADP ont tendance à se dissocier du filament. Il en résulte un mouvement de tapis roulant (ou treadmilling) des monomères de l'extrémité barbée vers l'extrémité pointée. Ce mouvement a pu être observé directement à l'aide de monomères d'actine fluorescents (Fujiwara et al., 2002)

On a vu précédemment qu'*in vivo*, la concentration d'actine est de l'ordre de 100µM. Or la moitié seulement de cette actine est présente sous forme d'actine-F. Au vu de la concentration critique de polymérisation, on s'attendrait pourtant à ce que 99% de l'actine soit sous forme filamenteuse. D'autre part la cellule est capable de réorganiser son cytosquelette en quelques secondes (Schleicher and Noegel, 1992). Il existe donc des systèmes de régulation de la polymérisation de l'actine *in vivo*.

En effet, l'actine interagit avec de nombreuses protéines, que ce soit sous sa forme actine-G ou actine-F. Les assemblages formés sont à l'origine de la motilité en permettant l'application de forces et la polarisation de la cellule. Nous allons maintenant détailler la nature de ces assemblages moléculaires en fonction de leur localisation dans la cellule et de leur rôle dans la motilité.

1.2.2 Polymérisation d'actine et protrusions au front avant de la cellule

Dans les protrusions, il y a polymérisation rapide des filaments d'actine (Condeelis, 1993). Les protéines chargées de réguler cette polymérisation peuvent être classées en 6 catégories (voir figure 1.8):

- **les protéines qui séquestrent l'actine globulaire (sequestering proteins)**:

Ce sont des protéines qui, en se liant à l'actine-G, abaissent la concentration d'actine-G libre au voisinage de la concentration critique. Les complexes formés constituent un réservoir d'actine-G facilement mobilisable grâce à leur faible affinité avec les monomères d'actine (Kd = 0,7 µM) (De La Cruz et al., 2000). La thymosine β4 et l'actobindin font partie de ces protéines. Il existe trois homologues de cette dernière chez *Dictyostelium*.

- **les profilines, qui lient l'actine-G et accélèrent l'échange de l'ADP en ATP :**

En facilitant l'échange de l'ADP en ATP au niveau d'une sous-unité d'actine-G, la profiline favorise la liaison de cette sous-unité à l'extrémité barbée d'un filament et donc accélère la polymérisation.

- **Les protéines qui aident la nucléation de filaments d'actine :**

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. Ceci permet d'accroître la capacité de l'actine à former de nouveaux filaments. Par exemple, citons le complexe Arp2/3 et la protéine WASP, les formines.

- **Les protéines de coupe ou de fragmentation** (severing proteins) :

Ces protéines se lient aux filaments d'actine et les coupent. Cela permet d'accélérer le turnover des monomères d'actine. C'est le cas par exemple de l'ADF/cofiline qui accélère la dépolymérisation des filaments d'actine à l'extrémité pointée du filament (Theriot, 1997).

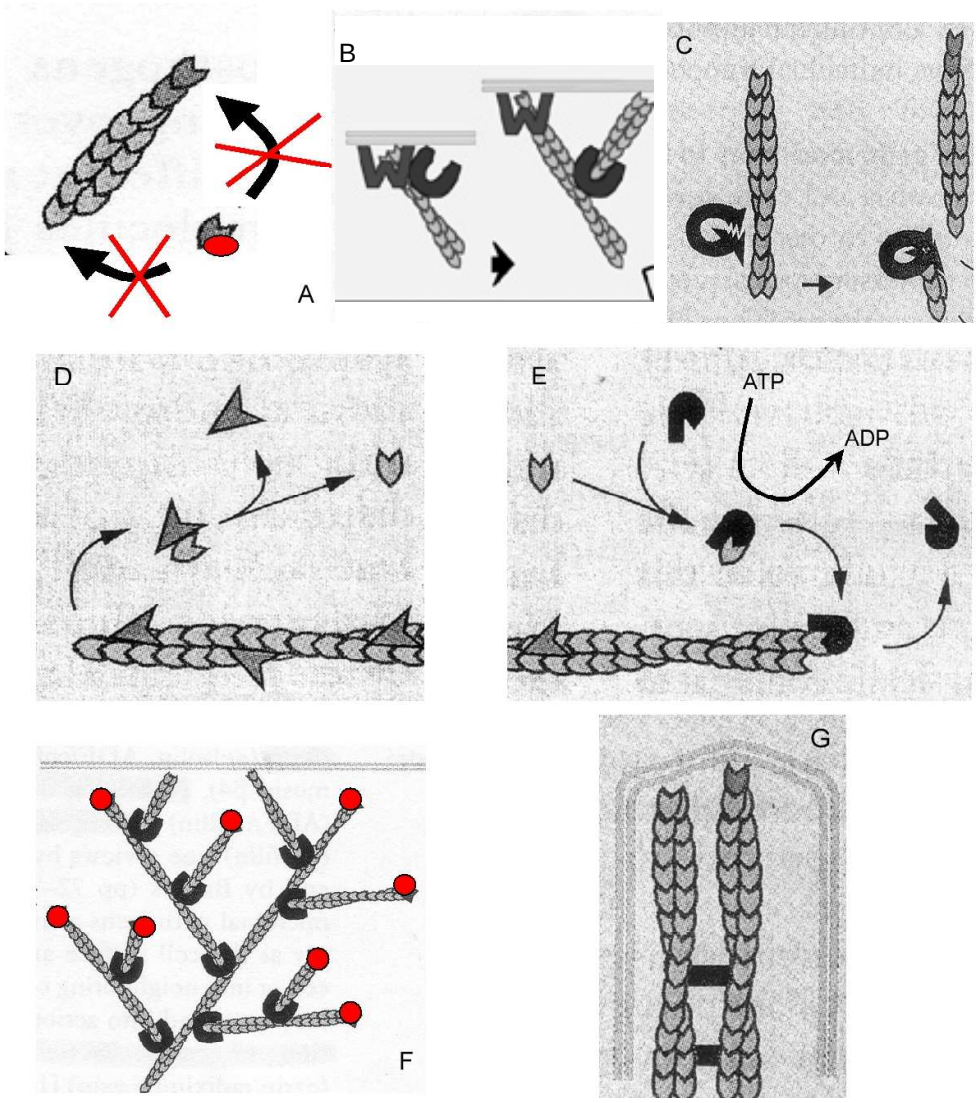


Figure 1.8 : Les protéines de liaison à l'actine. ***A.*** *Une protéine (rouge) séquestre un monomère d'actine-G.* ***B.*** *Protéines de nucléation, comme le complexe ARP2/3 (en forme de U) ou WASP (en forme de W).* ***C.*** *Protéine de coupe.* ***D.*** *ADF/cofiline, coupe les extrémités pointées et favorise la dépolymérisation.* ***E.*** *Profilines, se lient à l'actine-G et favorisent l'échange de l'ADP en ATP.* ***F.*** *Protéines de coiffe (rouge).* ***G.*** *protéine de réticulation. (tiré de (Borisy and Svitkina, 2000))*

- **Les protéines de coiffe (capping proteins) :**

Ces protéines se fixent aux extrémités des filaments d'actine, empêchant leur élongation. Cela favorise la densification du cytosquelette d'actine, et permet d'exercer des forces plus importantes. Parmi ces protéines, on peut citer cap32/34. (Eddy et al., 1996)

- **Les protéines de réticulation (cross-linking proteins) :**

Ces protéines lient les filaments d'actine entre eux. Cela permet de rigidifier les filaments d'actine.

Toutes ces familles de protéines sont présentes chez *Dictyostelium discoideum*. Pour une revue, on pourra consulter (Eichinger et al., 1999; Eichinger et al., 2005).

En partant de protéines purifiées, il a été montré qu'à partir d'un jeu de seulement cinq protéines (actine, ARP2/3, gelsoline, ADF et WASP) et en présence d'ATP on pouvait propulser des billes de quelques microns de diamètre (Carlier et al., 2003). Les forces mises en jeu ont été estimées, à l'aide de billes attachées à une micropipette, à quelques nN. (Marcy et al., 2004). Ce mouvement à base de polymérisation d'actine explique le déplacement de la bactérie *Listeria monocytogenes* dans le cytoplasme des cellules infectées. On retrouve ce type de structure au niveau des protrusions des cellules motiles ((Schafer et al., 1998), (Bretschneider et al., 2002), (Carlier et al., 2003)). Les forces mises en jeu au niveau de ces structures sont du même ordre de grandeur, bien que les variations entre types de cellules soient importantes (de 1 nN pour *Dictyostelium* à quelques dizaines de nN pour des fibroblastes par exemple, voir (Fukui et al., 2000) ou (Balaban et al., 2001)).

1.2.3 Complexe actine/myosine II et rétractions au front arrière de la cellule

Au niveau du front arrière des cellules, le cycle de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine est moins actif, et la force de contraction nécessaire à l'avancement de la cellule est produite non pas par la polymérisation de l'actine, mais par le déplacement de

moteurs moléculaires, notamment de la myosine II, sur les filaments existants. Le mouvement polarisé du moteur est assuré par l'association et la dissociation successive des deux têtes de la myosine II avec un filament d'actine.

La myosine II est une grosse protéine composée de deux chaînes lourdes (≈220kDa) et deux chaînes légères (≈20kDa). Chaque chaîne lourde peut elle-même être décrite comme l'association de deux domaines : une tête globulaire possédant des domaines de liaison à l'actine et à l'ATP, et une longue queue en hélice par laquelle sont reliées les deux chaînes lourdes (figure 1.9). Ces chaînes lourdes constituent le moteur moléculaire proprement dit, alors que les chaînes légères n'ont qu'un rôle de régulation de l'activité du moteur.

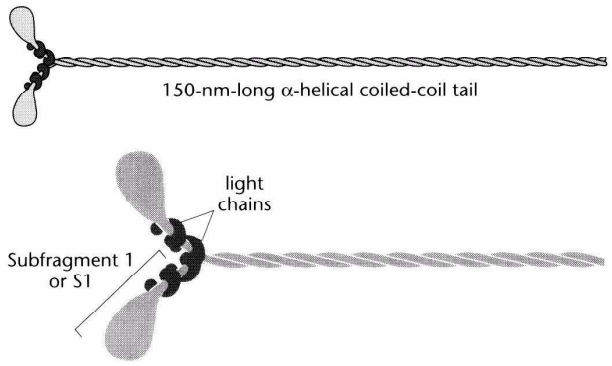


Figure 1.9 : Structure de la myosine II, montrant l'enchevêtrement des deux chaînes lourdes (gris) et des deux chaînes légères (noir) (Bray, 2001).

Les myosines II sont capables de s'associer pour former des agrégats bipolaires (figure 1.10). Ces assemblages se font via un site d'interaction situé sur la queue des myosines. Les myosines s'assemblent têtes bêches, d'où la formation d'une structure bipolaire présentant des têtes globulaires à chaque extrémité. Cette structure particulière permet aux agrégats de myosine de s'attacher à deux filaments d'actine en même temps. En se déplaçant sur ces filaments, elle provoque la contraction du réseau d'actine, lié à la membrane plasmique, et permet la traction de l'arrière de la cellule (figure 1.10).
Différents signaux régulent la contraction et l'assemblage des myosines, comme par exemple l'état de phosphorylation des différentes sous unités. La formation de multimères de myosine II nécessite la phosphorylation des chaînes légères de la myosine II par une myosin light chain kinase (MLCK). En effet, en l'absence de phosphorylation, la queue de la myosine est repliée et le site de liaison n'est pas exposé (figure 1.11).

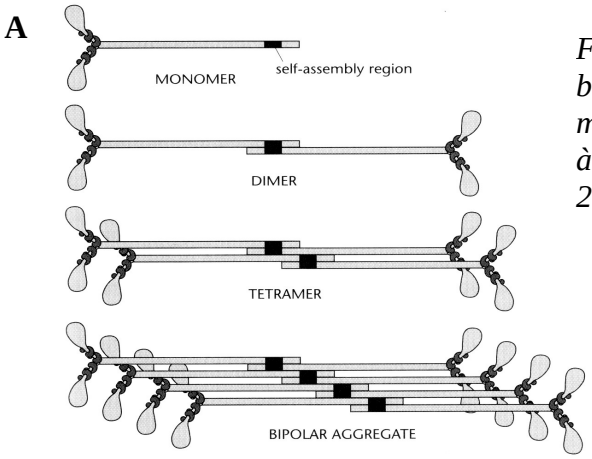
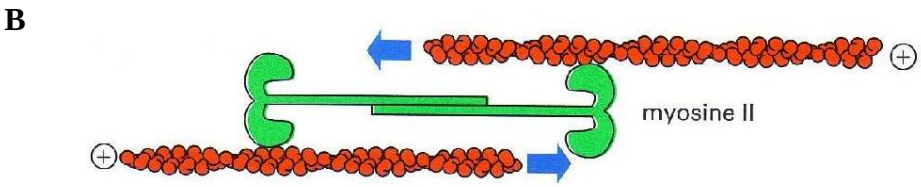


*Fig 1.10 : **A.** Agrégats bipolaires de molécules de myosine II. **B.** Contraction due à la myosine II (d'après (Bray, 2001) et (Alberts et al., 1994))*



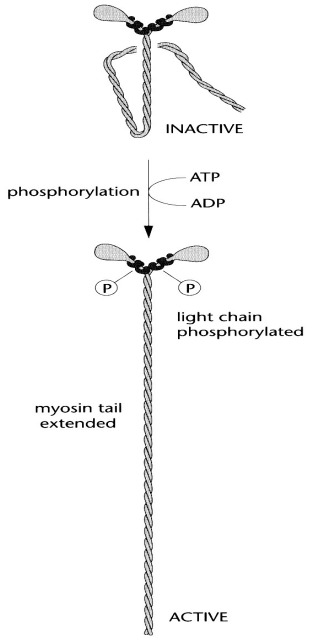


Fig 1.11 : La phosphorylation des chaînes légères de la myosine II entraîne un changement de conformation de la queue qui permet la liaison à d'autres myosines II. (d'après (Bray, 2001))

Au contraire, la déphosphorylation des chaînes lourdes est une condition nécessaire à la formation des agrégats de myosine II. Une fois ces agrégats formés, la phosphorylation des chaînes lourdes entraîne leur désassemblage. Chez *Dictyostelium*, trois kinases phosphorylant les chaînes lourdes ont été identifiées et notées MHCK-A, MHCK-B et MHCK-C (pour myosin heavy chain kinase). Elles ont toutes des localisations et des rôles distincts ((De la Roche et al., 2002),(Liang et al., 2002)).

L'existence de ces quatre kinases pour une même protéine montre l'importance d'une régulation fine des interactions entre myosine et filaments d'actine pour la cellule. La formation de complexes myosine II / filaments d'actine permet la production de forces de contraction lors de la division cellulaire et de la migration cellulaire. Dans les cellules motiles, ces complexes sont localisés au front arrière, et les cellules dépourvues de myosine II sont incapables de rétracter ce front arrière ((Fukui et al., 1987), (Uchida et al., 2003)).

1.2.4 Molécules de l'Adhésion cellulaire

Pour se déplacer sur une surface comme pour y exercer des forces, les cellules ont besoin de s'ancrer solidement sur le substrat. Ce lien avec le milieu extérieur se fait par l'intermédiaire de protéines d'adhésion. Suivant la nature des contacts, différentes molécules peuvent être impliquées. La famille des cadhérines intervient par exemple dans l'adhésion cellule-cellule. Pour ce qui est de l'adhésion entre une cellule et la matrice extracellulaire absorbée sur un substrat solide, les principales molécules impliquées chez les eucaryotes supérieurs sont les intégrines. Ce sont des protéines transmembranaires composées de deux sous-unités, notées α et β, et qui sont reliées d'une part à la matrice extérieure, et d'autre part au cytosquelette d'actine via des complexes de protéines appelés points focaux d'adhésion (figure1.12).

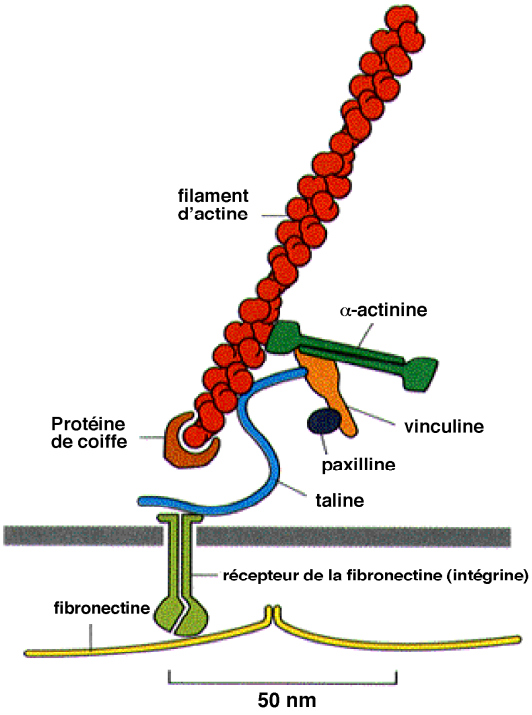


Fig 1.12 : représentation schématique d'un point focal d'adhésion. (Alberts et al., 1994)

Dans les points focaux des eucaryotes supérieurs, les intégrines servent de récepteurs en venant se fixer sur des molécules de la matrice extracellulaire (fibronectine , vitronectine ou laminine par exemple). Du côté intracellulaire, les intégrines interagissent avec différentes protéines comme la taline, la paxilline, la vinculine ou l'α-actinine qui sont également liés aux filaments d'actine. Les intégrines interviennent dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, via par exemple l'activation de MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinase), ou de la tyrosine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase). La signalisation induite peut dépendre finement des interactions avec la matrice extracellulaire. Par exemple, les liaisons des intégrines à deux domaines distincts de la laminine 1 induisent d'un côté l'activation de FAK et un remodelage du cytosquelette, permettant l'étalement et la migration des cellules, et de l'autre côté la phosphorylation d'Erk, permettant la survie à long terme des cellules (Desban et al., 2006).
De ce fait, ces points focaux sont non seulement des points d'adhésion privilégiés mais aussi de bons vecteurs pour transmettre des forces ou des signaux entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

L'existence de tels points focaux d'adhésion n'a pas été démontrée chez *Dictyostelium*, même si au niveau génomique l'amibe possède des homologues d'une partie des protéines impliquées dans ces complexes d'adhésion (taline, α-actinine). La taline est d'ailleurs impliquée dans l'adhésion cellulaire chez *Dictyostelium ((Niewohner et al., 1997)*,(Gebbie et al., 2004)). L'analyse du génome de *Dictyostelium* ne fait en revanche pas apparaître d'homologue des intégrines. Néanmoins, plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion ont été identifiées : les cellules dépourvues de SadA, une protéine à 9 domaines transmembranaires, ou de Phg1, autre protéine transmembranaire isolée dans un crible de mutants de phagocytose, ont un défaut d'adhésion très marqué ((Fey et al., 2002),(Benghezal et al., 2003; Cornillon et al., 2000)).
Plus récemment, une protéine membranaire impliquée dans l'adhésion de *Dictyostelium* a été découverte (Cornillon et al., 2006). Baptisée SibA (Similar to Integrin Beta), elle présente des séquences caractéristiques des β-intégrines et se lie à la taline. Cinq protéines de ce type ont été identifiées chez *Dictyostelium*, et pourraient être des homologues des β-intégrines des eucaryotes supérieurs. En revanche, aucun homologue des α-intégrines n'a été identifié chez *Dictyostelium* jusqu'à présent. J'ai participé à ce travail en réalisant des mesures de la

contrainte nécessaire pour détacher des cellules dépourvues de SibA (dispositif expérimental décrit dans la partie Matériels et Méthodes).

Sur un plan plus fonctionnel, des structures riches en actine, d'un diamètre de 0,5µm environ, ont été découvertes sur la face ventrale de cellules *Dictyostelium* (face en contact avec le substrat). La membrane plasmique est plus proche du substrat en ces points, appelés foyers d'actine (ou actin foci) (Uchida and Yumura, 2004). Les auteurs ont aussi montré à l'aide d'un substrat déformable que la transmission de forces au substrat se faisait via ces foyers d'actine. Ces structures ressemblent donc fonctionnellement aux points focaux d'adhésion.

D'autre part, les aires de contact avec le substrat ne sont pas les mêmes selon que la cellule est en phase végétative ou en phase de développement. Dans le cas d'une cellule végétative, la surface de contact, visualisée par RICM (Reflexion Interference Contrast Microscopy, voir Matériels et Méthodes), est équivalente à la surface projetée de la cellule. Pour des cellules en train d'agréger, les zones de contact sont beaucoup plus petites. La cellule doit donc être capable de réguler la dimension de ces zones. ((Weber et al., 1995) et figure 1.13)

Les connaissances sur l'adhésion de *Dictyostelium discoideum* sont donc encore partielles, et il reste du travail pour isoler tous les éléments intervenant dans ce processus, et comprendre le rôle de chacun.

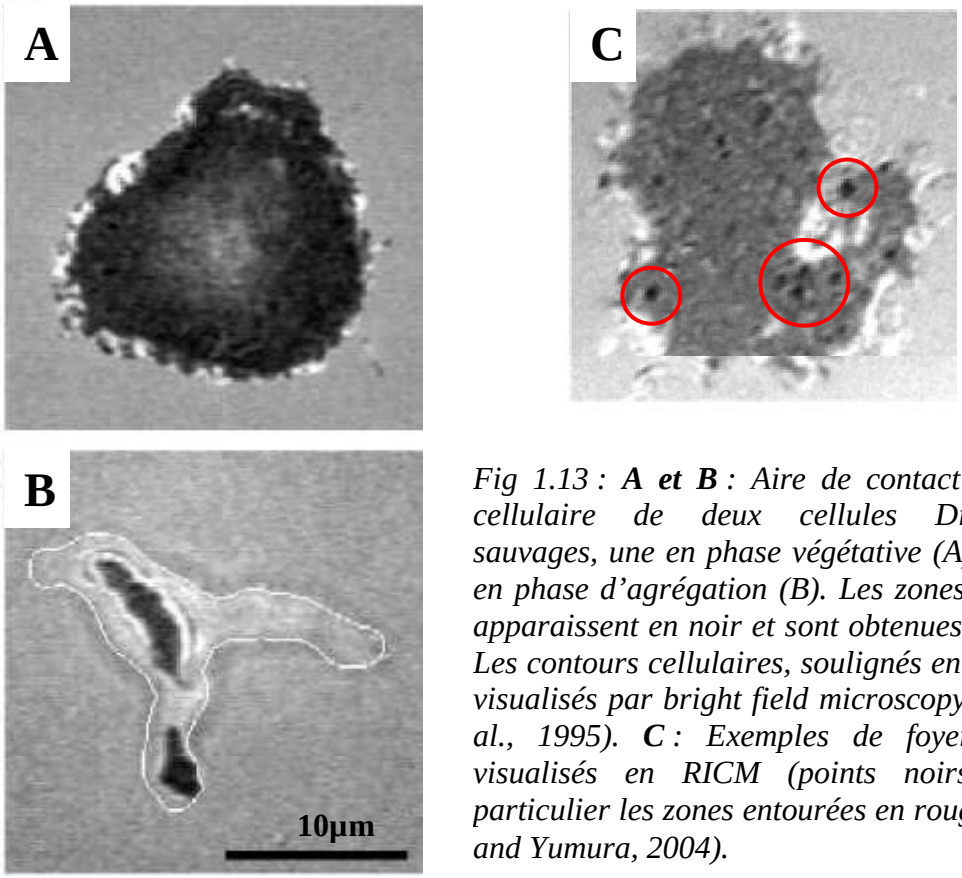


Fig 1.13 : ***A et B*** *: Aire de contact et contour cellulaire de deux cellules Dictyostelium sauvages, une en phase végétative (A), et l'autre en phase d'agrégation (B). Les zones de contact apparaissent en noir et sont obtenues par RICM. Les contours cellulaires, soulignés en blanc, sont visualisés par bright field microscopy. (Weber et al., 1995).* ***C*** *: Exemples de foyers d'actine visualisés en RICM (points noirs, voir en particulier les zones entourées en rouge) (Uchida and Yumura, 2004).*

Nous venons de voir quels assemblages moléculaires permettent à *Dictyostelium* d'adhérer sur des surfaces et de produire les forces nécessaires à sa motilité. Un déplacement efficace suppose également, comme on l'a vu, une bonne localisation de ces forces et une polarisation de la cellule. Nous allons maintenant décrire les voies de signalisation impliquées dans la polarisation des cellules *Dictyostelium discoideum*, notamment au cours du chimiotactisme.

1.3 Voies de signalisation impliquées dans la polarisation cellulaire et le chimiotactisme

Le chimiotactisme est un processus par lequel un gradient chimique extérieur est détecté par des récepteurs cellulaires, ce qui conduit à un mouvement dirigé de la cellule dans la direction du gradient.
Dictyostelium discoideum a beaucoup été utilisé pour découvrir et comprendre les voies de signalisation permettant à une cellule de se polariser et de se déplacer dans un gradient de chimioattractant (pour des revues, voir (Parent and Devreotes, 1999), (Kimmel and Parent, 2003), (Merlot and Firtel, 2003), (Parent, 2004)).

Dictyostelium possède des récepteurs à l'AMPc uniformément répartis à la surface de sa membrane plasmique. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G hétérotrimériques, protéines composées de trois sous unités α, β et γ et se liant au GDP à l'état inactif. La liaison de l'AMPc à son récepteur entraîne l'activation catalytique de protéines $G_{\alpha\beta\gamma}$, par échange du GDP en GTP. Les sous unités G_α et $G_{\beta\gamma}$ se dissocient alors et servent de messager intracellulaire pour activer différentes voies de signalisation. Les principales sont (Kimmel and Parent, 2003):

- La régulation de la concentration locale en $PI(3,4,5)P_3$, via l'activation et le recrutement à la membrane des phosphoinositide 3-kinases (PI3K), qui phosphorylent le lipide $PI(4,5)P_2$ en $PI(3,4,5)P_3$, et la dissociation de la membrane de PTEN (phosphatase and tensin homolog), qui joue le rôle inverse des PI3K.
- l'activation de la guanylyl cyclase (GC), qui catalyse la transformation d'une molécule de GTP en une molécule de GMPc. Le GMPc joue un rôle de second messager intracellulaire.

- l'activation de l'adenylyl cyclase (ACA), qui catalyse la transformation d'une molécule d'ATP en une molécule d'AMPc. Lors de la phase d'agrégation du développement, une partie de cet AMPc est sécrétée. Les cellules *Dictyostelium* relayent ainsi des vagues d'AMPc qui permettent aux cellules suivantes de rejoindre le centre de l'agrégat.

A l'endroit où la concentration de chimioattractant est la plus grande, c'est-à-dire au front avant de la cellule, les PI3K sont activées par des protéines de la famille Ras, et recrutées à la membrane plasmique. A l'inverse, PTEN, qui en l'absence de signal est présent à la membrane grâce à son domaine de liaison au PIP_2, se détache de la membrane au front avant. (Funamoto et al., 2002). PTEN est alors localisé sur les côtés et à l'arrière de la cellule, à l'inverse de PI3K. Cette localisation a pour conséquence une accumulation de $PI(3,4,5)P_3$ au front avant de la cellule. Le PIP_3 a donc un rôle essentiel dans la polarisation et la motilité cellulaire. Dans la cascade de signalisation en réponse à une stimulation chimique, c'est l'élément connu le plus amont qui présente une asymétrie dans la cellule (voir figure 1.14).

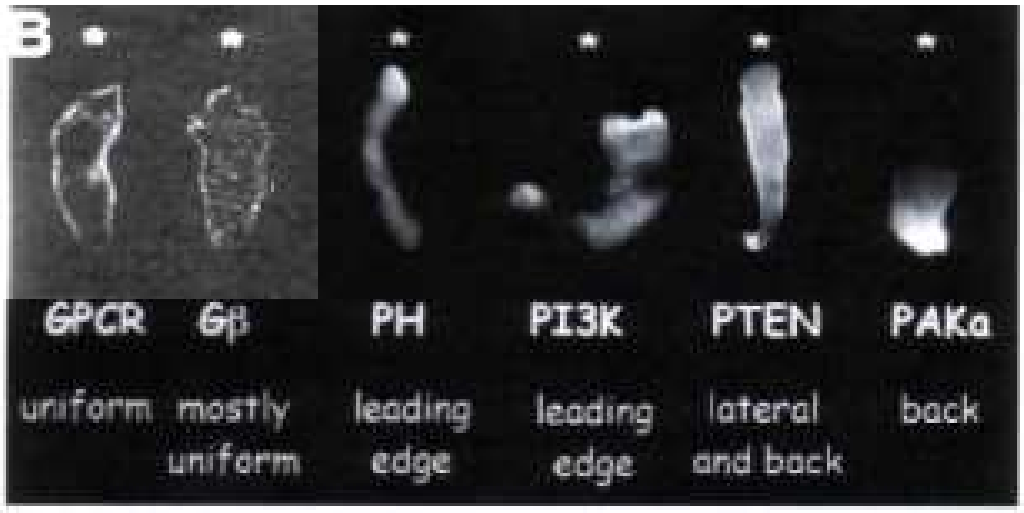


Fig 1.14 : Illustration de la polarisation de cellules chimiotactiques : l'étoile en haut de chaque image indique la source de chimioattractant. Les GPCR (récepteurs couplés aux protéines G) et sous unités β des protéines G sont répartis uniformément dans la cellule. Les PI3-kinases (PI3K) et les protéines à domaine PH sont localisées à l'avant de la cellule. PTEN et PAKa sont localisées sur les côtés et au front arrière. (Comer and Parent, 2002)

L'accumulation de PIP_3 au front avant entraîne le recrutement de protéines possédant un domaine de liaison au PIP_3, comme les domaines PH par exemple (pour Plekstrin Homology). Parmi ces protéines, on trouve PhdA (PH domain-containing protein A) la kinase Akt, CRAC

(cytosolic regulator of adenylyl cyclase) mais aussi des protéines comme WASP, agissant directement sur le cytosquelette d'actine. Suite à leur recrutement, la polymérisation d'actine au front avant de la cellule et donc la formation de protrusions, sont stimulées.
La signalisation induite par le gradient intracellulaire de PIP_3 ne se limite pas au front avant. Akt par exemple active PAKa (p21 activated kinase A), qui se relocalise au front arrière et régule l'assemblage des myosines II. C'est aussi le cas d'une autre cascade de signalisation impliquant le GMPc, via l'activation de kinases qui phosphorylent la chaîne régulatrice de la myosine (Bosgraaf et al., 2002). Le rôle de ces assemblages de myosine-II du côté opposé au côté stimulé par l'AMPc est double : permettre la contraction du bord cellulaire, mais aussi empêcher l'apparition de protrusions au front arrière.
Toutes ces voies de signalisation permettent à la cellule de se polariser, en définissant un front avant où l'actine polymérise et un front arrière où la cellule se contracte sous l'action de la myosine II. (figure 1.14 et 1.15)

Les cellules phagocytaires comme *Dictyostelium* ou les neutrophiles sont capables de s'orienter dans des gradients de chimioattractant très faibles, avec des différences de concentration de l'ordre de 2% entre l'avant et l'arrière de la cellule. Pour obtenir une réponse bien polarisée comme décrite précédemment, il doit exister un mécanisme d'adaptation et d'amplification capable de créer un gradient intracellulaire beaucoup plus important que le gradient de chimioattractant.
Ce mécanisme d'amplification fait intervenir des boucles de feedback positif ou négatif entre plusieurs protéines (Weiner et al., 2002). On peut citer par exemple au front avant une boucle de feedback positif impliquant le PIP3, les PI3-kinases, la polymérisation d'actine et des petites protéines G comme Rac ((Charest and Firtel, 2006), voir figure 1.15). De plus, les signalisations au front avant et arrière de la cellule s'excluent mutuellement (Xu et al., 2003), ce qui renforce la polarisation cellulaire. Enfin, on peut noter que P. Devreotes a montré que le gradient de PI3K, mais pas celui de PTEN, présentait une amplification par rapport au gradient extérieur d'AMPc (Janetopoulos et al., 2004).

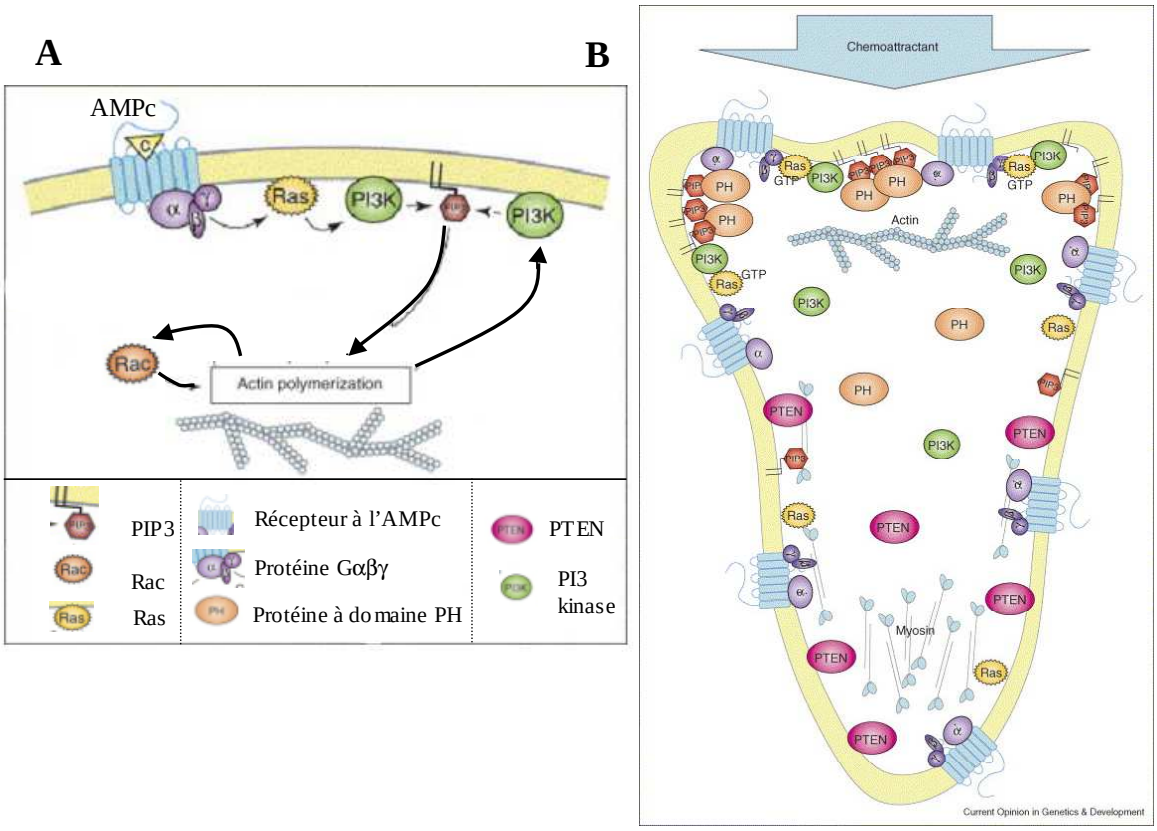


Fig 1.15 : Voies de signalisation impliquées dans le chimiotactisme (Charest and Firtel, 2006). ***A*** *: Au front avant, activation des PI3-kinases via Ras suite à la liaison de l'AMPc sur son récepteur. La signalisation liée au PIP_3 induite par les PI3K stimule la polymérisation de l'actine. Des boucles de feedback existent, impliquant notamment les PI3K, Rac et la polymérisation d'actine.*
B *: Localisation cellulaire des protéines impliquées dans le chimiotactisme chez Dictyostelium : les récepteurs et protéines $G\alpha\beta\gamma$ sont répartis uniformément ; les PI3K et les protéines à domaine PH sont à la membrane du côté de la source de chimioattractant, où l'actine polymérise ; PTEN se trouve sur les côtés et à l'opposée de la source chimique, à proximité de la myosine II.*

D'autre part, un modèle a été développé par le groupe de P. Devreotes pour expliquer la polarisation cellulaire dans un gradient de chimioattractant. Ce modèle dit LEGI (Local Excitation and Global Inhibition) se base sur l'idée que la liaison d'un chimioattractant à son récepteur entraîne une activation locale et rapide de la cellule, suivie d'une inhibition globale, plus lente. L'activation locale augmente proportionnellement à la fraction locale de récepteurs occupés. L'inhibition globale augmente proportionnellement à la fraction globale de récepteurs occupés sur toute la cellule. En régime permanent, dans un gradient chimique, à l'avant de la cellule, l'excitation dépasse l'inhibition, ce qui mène à une réponse positive

persistante. A l'arrière, l'inhibition dépasse l'excitation et la réponse est négative ((Janetopoulos et al., 2004) ; (Parent and Devreotes, 1999), voir figure 1.16).

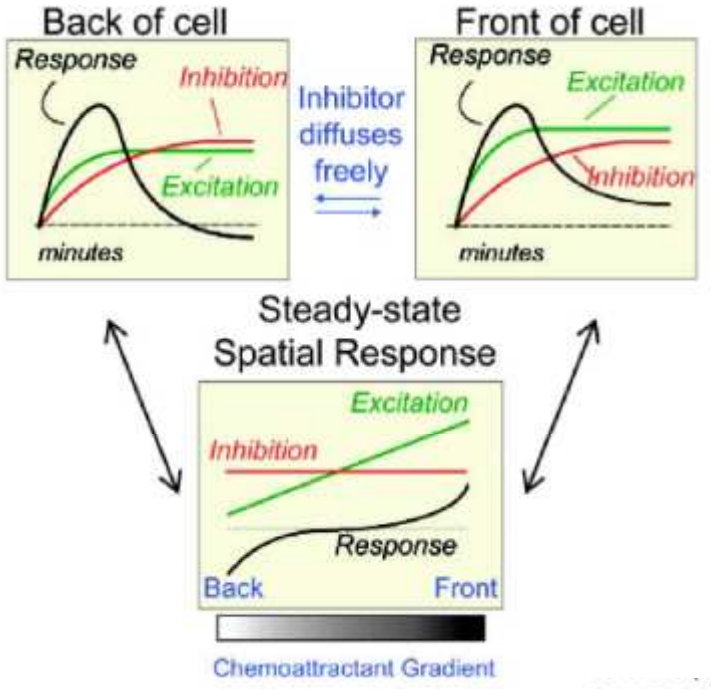


Fig 1.16 : Réponse à un gradient chimique, le modèle LEGI : Excitation locale et inhibition globale. La réponse est positive au front avant, où l'excitation dépasse l'inhibition, et négative au front arrière, où l'inhibition dépasse l'excitation. (Janetopoulos et al., 2004)

Enfin, il faut remarquer que percevoir un gradient, y répondre en se polarisant, et se déplacer dans la direction du gradient sont trois choses distinctes. Dans des cellules exprimant la protéine fluorescente CRAC-GFP (protéine possédant un domaine PH) et dont le cytosquelette d'actine a été dépolymérisé par ajout de latrunculine A, CRAC-GFP se relocalise toujours face à la plus grande concentration d'AMPc. La cellule perçoit donc le gradient. En revanche, faute de cytosquelette fonctionnel, elle garde une forme ronde, non polarisée, et ne se déplace pas (figure 1.17).

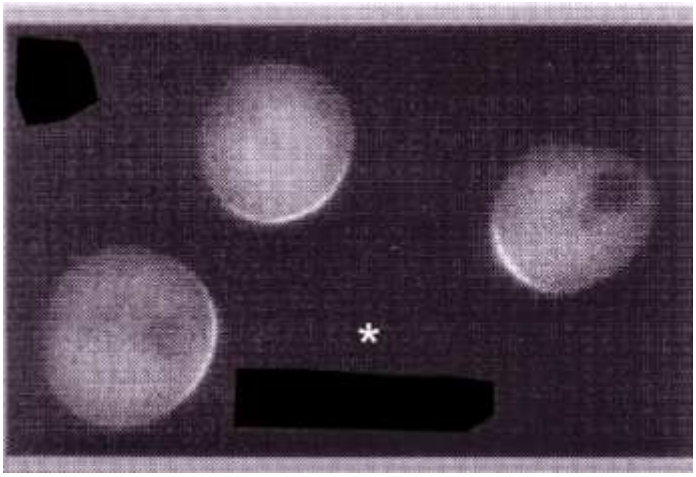


Fig 1.17 : Sensibilité directionnelle et polarisation cellulaire. Des cellules exprimant la protéine CRAC-GFP sont traitées avec 0,5µM de latrunculine et placées dans un gradient d'AMPc (source d'AMPc indiquée par l'étoile). Les cellules montrent un front de CRAC-GFP orienté vers la source d'AMPc mais gardent une forme ronde. Les cellules ont donc perçu la direction du gradient même si elles ne sont pas capables de se polariser. (Parent and Devreotes, 1999)

L'inverse peut également être vrai, et des cellules *Dictyostelium* n'exprimant pas le gène *aimless*, par exemple, sont capables de se déplacer et donc de se polariser, mais sont incapables de répondre à un gradient chimique (Insall et al., 1996). Ceci suggère que les mécanismes qui permettent à une cellule de percevoir un signal extérieur et de se déplacer sont au moins partiellement distincts. Il reste donc beaucoup à faire pour comprendre comment une cellule est capable de choisir une direction et de la maintenir, notamment en l'absence de gradient chimique extérieur.

1.4 Mécano-sensibilité cellulaire.

Les récepteurs à chimioattractant ne sont pas les seuls capteurs dont se servent les cellules pour sonder leur environnement et répondre à des stimulations extérieures. Certaines cellules sont également capables de réagir à la lumière, à des signaux électriques, ou encore à des forces mécaniques, comme nous allons en donner plusieurs exemples dans la suite.

1.4.1 Exemples de cellules mécano-sensibles

La sensibilité mécanique est particulièrement importante dans certaines cellules sensorielles spécialisées. Les cellules ciliées de l'oreille interne, qui jouent un rôle fondamental dans l'audition, sont des cellules spécialisées dans la transduction du signal mécanique en signal chimique et électrique. Ces cellules sont disposées sur la membrane basilaire de l'oreille interne, et possèdent à leur surface des cils associés en paquets. Ces cils sont reliés entre eux par des petits liens mécaniques (tip-links) qui contrôlent l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques (figure 1.18). Lors de l'audition d'un son, les vibrations sonores provoquent des déformations de la membrane basilaire, ce qui a pour effet de faire bouger les cils les uns par rapport aux autres. Ce déplacement étire les tip-links, et induit l'ouverture de canaux ioniques. La cellule transmettra ensuite l'information au nerf auditif (Strassmaier and Gillespie, 2002).

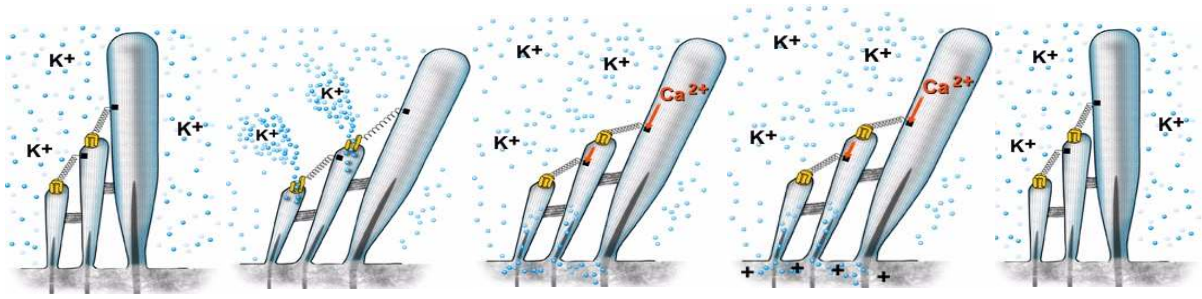


Fig 1.18 : *Mécano-sensibilité des cellules ciliaires de l'oreille interne* : *la force mécanique déforme les cils, ce qui étire les tip-links et ouvre un canal transmembranaire qui laisse entrer des ions potassium qui dépolariseront la membrane. L'activation d'un moteur moléculaire par le calcium permet de refermer les canaux, et arrête le flux ionique. Les cils reviennent ensuite à leur configuration initiale.*

D'autres cellules, même non spécialisées, sont capables de répondre à l'application d'une contrainte mécanique extérieure. Si on soumet un tapis de cellules endothéliales à un flux de 2 Pa, on constate au bout de 24h que les cellules se sont orientées selon la direction du flux et ont réorganisé leur cytosquelette (voir figure 1.19). Cette réponse fait intervenir le calcium intracellulaire. (Malek and Izumo, 1996)

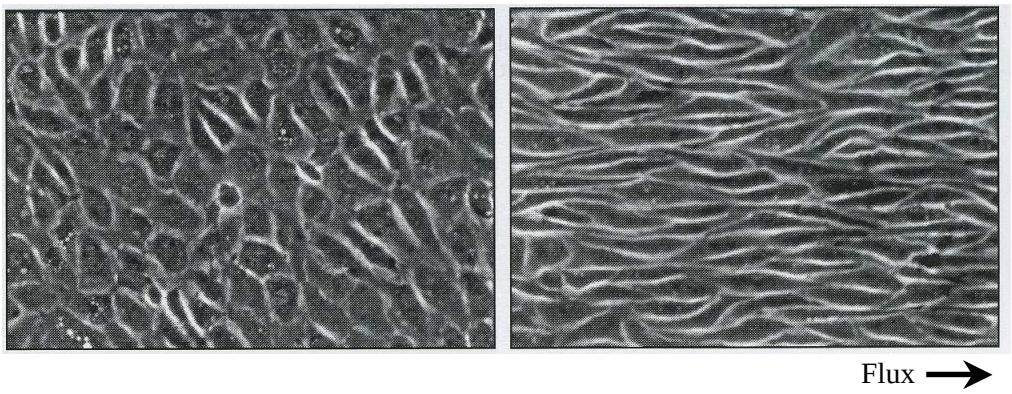


Fig 1.19 : ***A.*** *Culture de cellules endothéliales provenant de vaisseaux sanguins bovins. Elles forment un tapis cellulaire confluant, mais leur orientation est isotrope.* ***B.*** *La même culture soumise à un flux de 2 Pa pendant 24 heures. Cette pression correspond au flux sanguin. Les cellules se sont alignées dans la direction du fluide. (Malek and Izumo, 1996).*

Les cellules *Dictyostelium* sont elles aussi sensibles à un flux hydrodynamique : des cellules adhérant sur une surface de verre ont une motilité exploratoire à une vitesse de l'ordre de 3 à 5 µm/min, et changent de direction toutes les une à deux minutes environ. Lorsqu'on applique sur ces cellules un flux hydrodynamique suffisamment faible pour ne pas les décoller, les cellules répondent à la stimulation mécanique en migrant sur le substrat dans le sens de la force appliquée. Plus la contrainte de cisaillement due au flux est importante, plus le mouvement des cellules est rapide et plus il est orienté (figure 1.20, (Decave et al., 2003)).

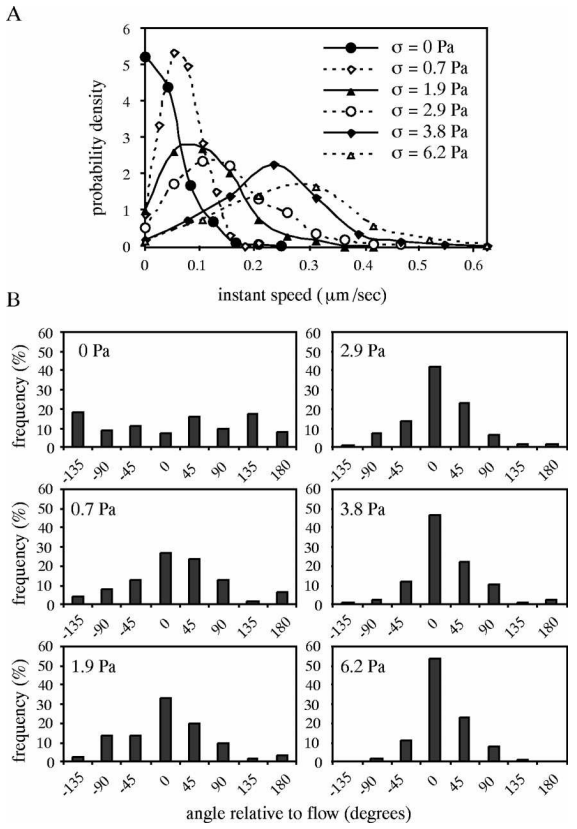


Fig 1.20 : ***A.*** *Distribution de probabilité des vitesses instantanées moyennes du centre de masse des cellules en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée.* ***B.*** *Orientation cellulaire moyenne en fonction de la contrainte appliquée. Il s'agit de l'angle entre la direction du flux et le vecteur vitesse instantané d'une cellule (Decave et al. 2003).*

De plus, cette observation ne reflète pas un simple effet mécanique du flux qui pousserait les cellules. En effet, l'inhibition des PI3-kinases par ajout de LY294002 ne diminue pas la vitesse des cellules sous flux, mais rend le mouvement isotrope (figure 1.21). Il y a donc deux signalisations mises en jeu dans la réponse des cellules à un flux, l'une impliquant les PI3-kinases et régulant la directionalité des cellules, et l'autre contrôlant leur vitesse.

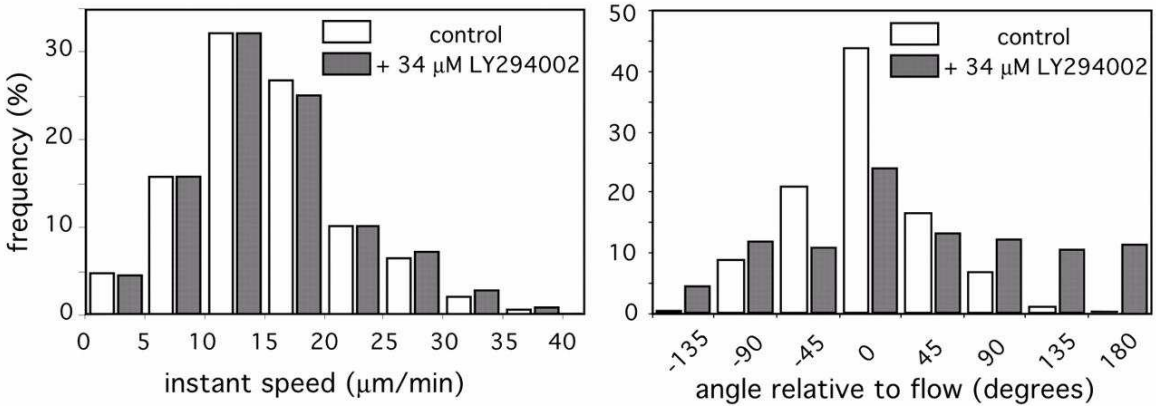


Fig 1.21 : L'ajout d'un inhibiteur de la PI3K ne change pas la vitesse des cellules sauvages AX2 soumises à un flux de 1,8 Pa. En revanche, le mouvement devient isotrope (Decave et al. 2003).

1.4.2 Mécanismes moléculaires de la mécano-sensibilité

Canaux mécano-sensibles

Il doit donc exister dans toutes ces cellules des systèmes permettant de sentir une contrainte mécanique extérieure et de déclencher une voie de signalisation spécifique en réponse.
Les premiers candidats pour de telles fonctions sont les canaux ioniques. De nombreux canaux mécano-sensibles ont été découverts, dans des organismes variés (bactéries, drosophiles, cellules mammifère,…voir (Hamill and Martinac, 2001) pour une revue). Tous ces canaux ont des structures diverses et aucune séquence caractéristique de la mécano-sensibilité n'a pu être identifiée. On peut néanmoins donner quelques exemples de ces canaux.

Un des plus étudié est le canal MscL d'Escherichia coli. Ce canal est constitué de cinq sous-unités comportant chacune deux domaines transmembranaires. Il joue un rôle dans la réponse

de la bactérie à un choc osmotique (Ajouz et al., 1998). Des expériences de patch-clamp sur des liposomes contenant la protéine purifiée ont montré que l'ouverture du canal dépend directement de la tension de la membrane (figure 1.22).

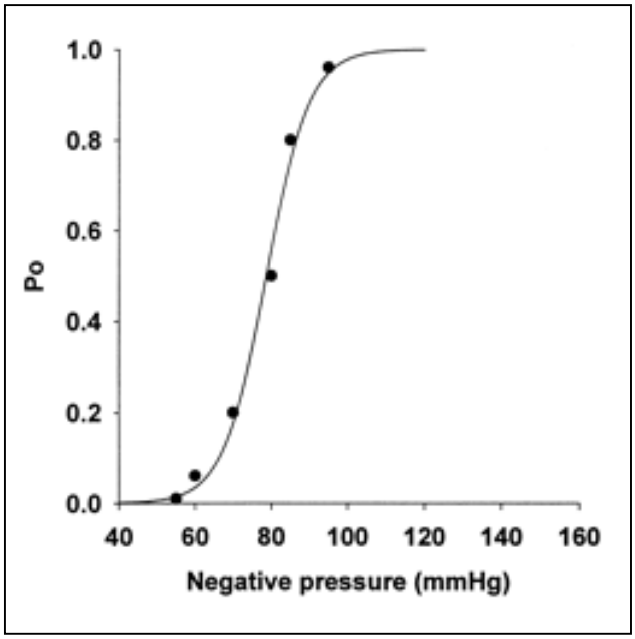


Fig 1.22 : Probabilité d'ouverture Po d'un canal MscL en fonction de l'aspiration (pression négative) appliquée sur la membrane par une micropipette (Hamill and Martinac, 2001).

Le mécanisme proposé met en jeu une variation de la surface membranaire occupée par le canal. Il comporte deux étapes, décrites sur la figure 1.23 :

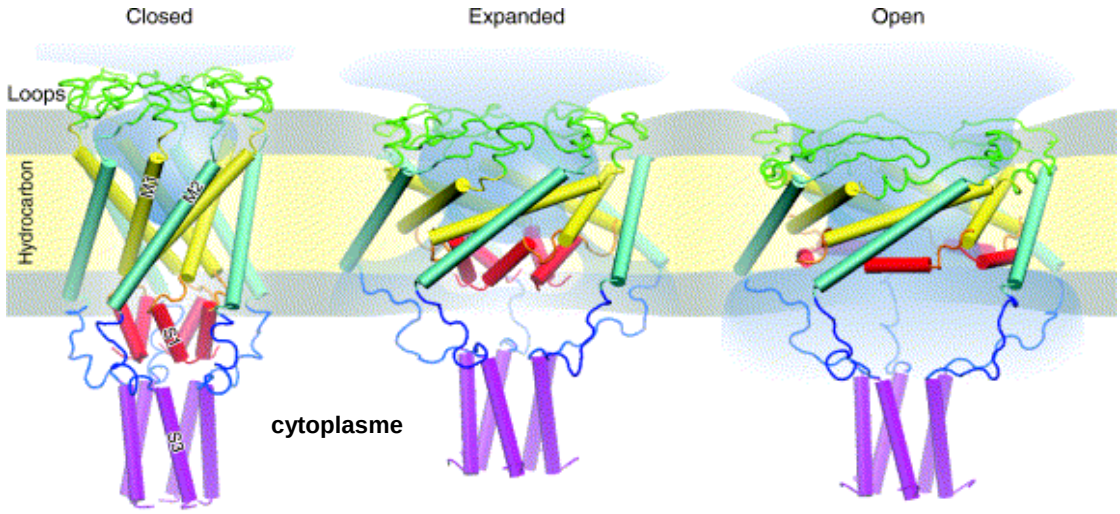


Fig 1.23 : Mécanisme proposé pour l'ouverture du canal MscL par la tension membranaire : A gauche, le canal est doublement fermé par l'enchevêtrement des hélices transmembranaires M1 et M2 d'une part (jaune et bleu clair), et des hélices S1 (rouge) d'autre part. L'augmentation de la tension membranaire, fait pivoter les extrémités des hélices M1 et M2, les hélices s'éloignent les unes des autres et le canal s'aplati et s'ouvre partiellement, la porte formée par les hélices S1 restant fermée (figure du milieu, les zones où l'eau peut pénétrer sont indiquées en bleu). Lorsque le canal continue à s'élargir ces hélices s'écartent à leur tour et le canal est complètement ouvert (figure de droite). D'après (Sukharev and Anishkin, 2004)

Ce mécanisme d'ouverture impliquant une expansion du canal induite par la tension membranaire n'est pas le seul mécanisme proposé pour des canaux mécano-sensibles. Certains canaux sont reliés au cytosquelette et les forces transmises par le cytosquelette pourraient ouvrir la porte du canal, à l'image du rôle des tip-links des cellules ciliées de l'oreille interne (figure 1.24, (Hamill and McBride, 1996), (Gillespie et al., 2005)).

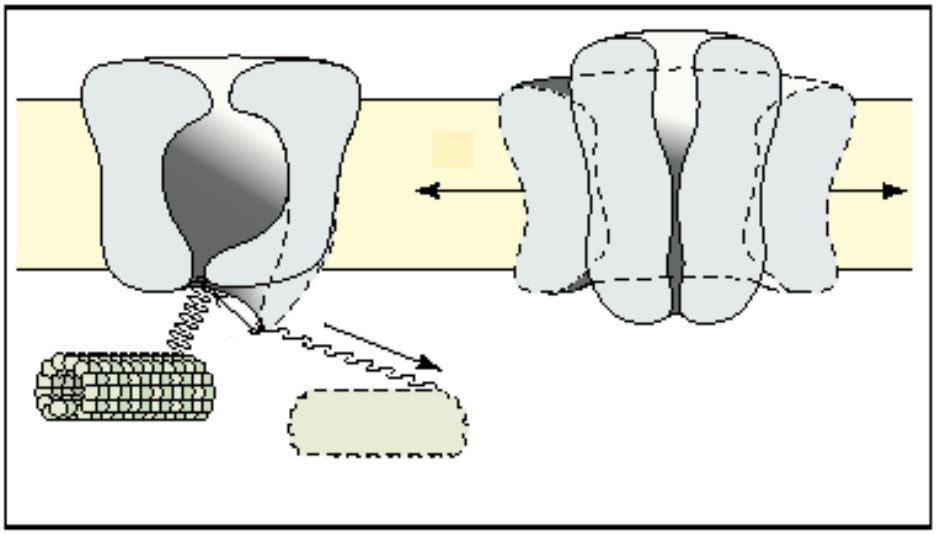


Fig 1.24 : Principes de l'ouverture des canaux mécano-sensibles. A gauche, canal ouvert par l'attachement au cytosquelette. A droite canal ouvert par l'extension de la membrane plasmique. (Sukharev and Anishkin, 2004)

La famille des TRP (pour Transcient receptor potential) constitue d'autres canaux qui interviennent dans de nombreux phénomènes de sensation, comme la perception de la température, de la lumière, ou du toucher. Les canaux TRP tirent leur nom du premier récepteur identifié chez la drosophile, où une mutation sur le gène trp d'une cellule photoréceptrice induit une réponse transitoire à un signal lumineux continu (Minke, 1977). Les propriétés, fonctions et modes de régulation de ces canaux sont très variés, mais ils présentent tous six domaines transmembranaires et un pore prédit entre le $5^{ième}$ et le $6^{ième}$ domaine. De tels canaux ont été décrits dans diverses espèces, allant des nématodes à l'homme en passant par la drosophile. (pour une revue, voir (Clapham, 2003) ou (Moran et al., 2004))

Nous allons revenir plus en détail sur un de ces canaux, TRPP2, aussi appelé PKD2, pour Polycystic Kidney Disease. Cette maladie, caractérisée par la présence de kystes au niveau du rein, est liée à des mutations sur deux gènes, notés *pkd1* et *pkd2*. La perte de fonction d'une

seule des deux protéines correspondantes (notées PKD1 et PKD2 dans la suite) suffit à induire la maladie (Delmas et al., 2004). PKD2 est une protéine de 968 acides aminés qui présente 6 domaines transmembranaires et possède les propriétés d'un canal calcique (Gonzalez-Perrett et al., 2001). PKD1 est une grosse protéine (4300 aa) possédant 11 domaines transmembranaires, une extrémité C-terminale intracellulaire assez courte et un long domaine N-terminal extracellulaire (voir (Delmas, 2004), (Anyatonwu and Ehrlich, 2004) pour des revues). Les deux protéines possèdent également, entre autre, un domaine coiled-coil C-terminal. PKD1 et PKD2 interagissent via ces domaines coiled-coil (Hanaoka et al., 2000).

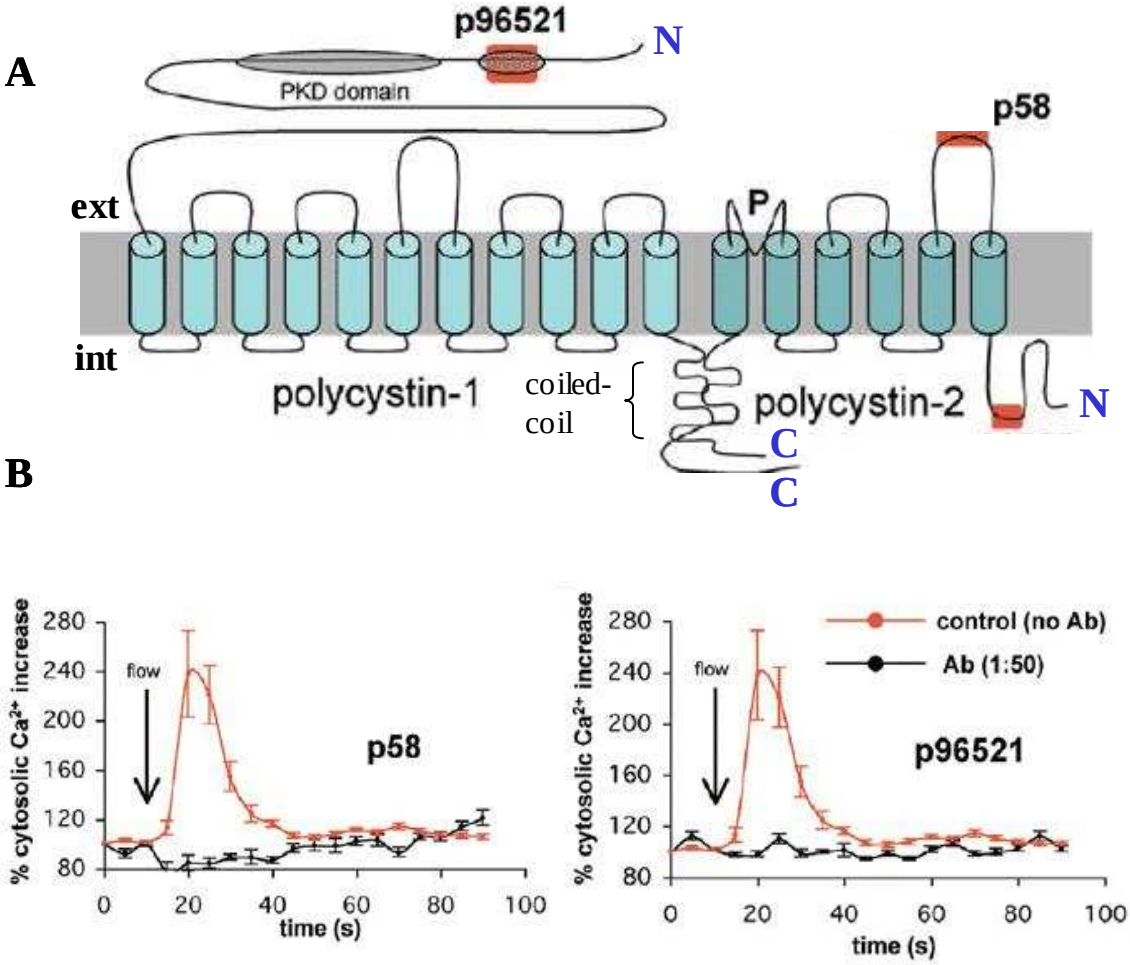


Fig 1.25 : Le complexe PKD1-PKD2 permet une augmentation du calcium intracellulaire en réponse à une stimulation par un flux.
A : *Des anticorps ont été utilisés pour bloquer spécifiquement les domaines extracellulaires de PKD1 (p96521) et PKD2 (p58). Les zones de fixation des anticorps sont indiqués sur le schéma.*
B : *Suite à l'application d'un flux sur les cellules, la concentration cytosolique en calcium libre augmente transitoirement (courbe rouge). L'ajout d'un des deux anticorps suffit à éliminer la réponse calcique liée à l'application d'un flux. Un complexe formé de PKD1 et PKD2 fonctionnels est donc essentiel pour percevoir et répondre à un flux. (Nauli et al., 2003)*

Le complexe ainsi formé est sensible aux forces mécaniques exercées par le flux hydrodynamique au niveau du cil des cellules épithéliales rénales. Il induit une réponse calcique intracellulaire. La présence de PKD1 et de PKD2 fonctionnels est essentielle pour cette réponse, tout comme l'interaction entre ces deux protéines via leur domaine coiled-coil. ((Nauli et al., 2003), voir figure 1.25).
La formation de kystes dans la Polycystic Kidney Disease pourrait résulter d'une croissance désordonnée des cellules épithéliales rénales, liée à une mauvaise perception du flux rénal (Fischer et al., 2006).

Cette augmentation de la concentration en calcium est directement liée à l'entrée de calcium extracellulaire via le canal PKD2. Au sein du complexe, PKD1 semble jouer un rôle de régulateur de l'ouverture du canal PKD2. Cette idée est d'ailleurs soutenue par des observations faites chez les oursins : des homologues des PKD1 et PKD2 y sont exprimés dans les spermatozoïdes, où ils contrôlent la réaction acrosomale lors de la fertilisation (exocytose de vésicules acrosomales suite à une entrée de calcium dans la cellule au moment du contact entre spermatozoïde et œuf). Dans cette réaction, un domaine extracellulaire de l'homologue de PKD1, appelé domaine REJ (Receptor Egg Jelly), interagit avec la surface de l'œuf, ce qui ouvre le canal homologue de PKD2 et permet l'entrée de calcium (figure 1.26).

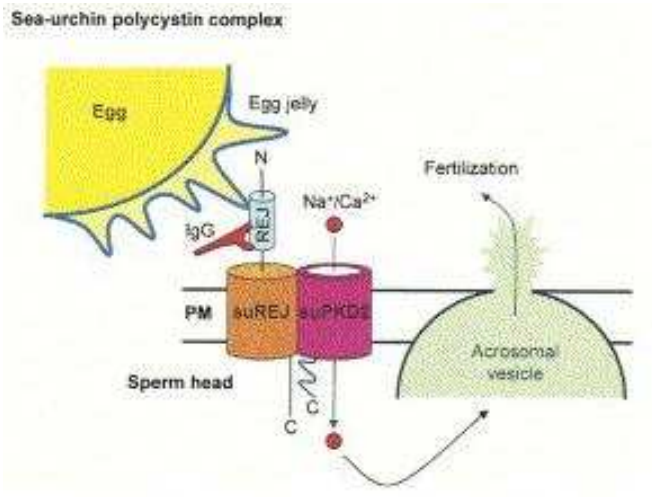


Fig 1.26 : Chez l'oursin, l'entrée de calcium qui déclenche la réaction acrosomale est médiée par un complexe homologue de PKD1/PKD2. (Delmas, 2004)

Points focaux d'adhésion

D'autres structures sont également impliquées dans la mécano-transduction. Les zones d'adhésion sont comme on l'a vu des zones privilégiées pour la transmission de forces au substrat. A l'inverse, des structures comme les points focaux d'adhésion peuvent traduire des contraintes mécaniques extracellulaires en signaux chimiques intracellulaires. En utilisant des

substrats micro-structurés, il a été montré que la taille et la forme des points focaux d'adhésion de fibroblastes étaient corrélées avec l'amplitude et l'orientation des forces exercées par la cellule sur le substrat. ((Balaban et al., 2001), voir figure 1.27)

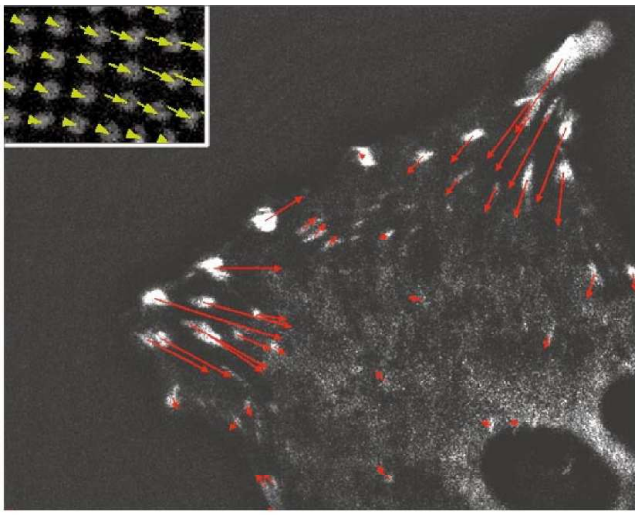


Fig 1.27 : Corrélation entre la taille et la forme des points focaux d'adhésion, visualisés grâce à la vinculine-GFP, et les forces exercées par un fibroblaste sur le substrat (flèches rouges), mesurées grâce au déplacement du substrat micro-structuré (cadre en haut à gauche). (Balaban et al., 2001)

De plus, l'application locale d'une force extérieure sur la surface de fibroblastes, via une micropipette, induit une élongation des points d'adhésion, impliquant notamment le cytosquelette d'actine et le recrutement de protéines comme la vinculine (Riveline et al., 2001). Les complexes d'adhésion évoluent donc en fonction des forces auxquelles ils sont soumis. Ce mécanisme d'adaptation fait intervenir une signalisation biochimique via des petites protéines G de type Rho. De plus, ces structures contiennent des molécules de signalisation de type tyrosine kinases ou phosphatases comme FAK (focal adhesion kinase) ou Scr qui jouent un rôle de signalisation en lien avec l'adhésion (Yamada and Geiger, 1997), permettant à la cellule de tester les propriétés du substrat sur lequel elle évolue. En cultivant des cellules sur un substrat extensible, Le groupe de M. Sheetz. a d'ailleurs montré qu'une contrainte d'extension appliquée via le substrat induisait l'activation de voies de signalisations impliquant les MAP kinases ERK, JNK et p38 (figure 1.28 et (Sawada et al., 2001)). Cette observation rejoint celle décrite précédemment concernant l'activation des MAP kinases par les intégrines.

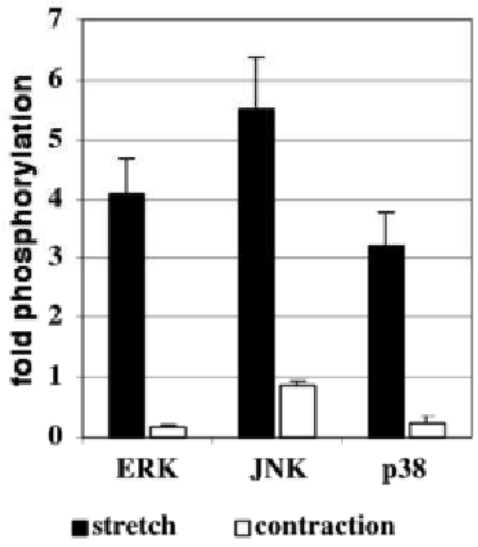


Fig 1.28 : *Activation des MAP kinases par l'extension du substrat :*
Les cellules adhèrent soit sur un substrat pré-étiré, qui se contracte quand on le relâche (contrainte de contraction, barres blanches) soit sur un substrat au repos qui est ensuite étiré (contrainte de stretching ou d'extension, barres noires). Le niveau de phosphorylation des protéines ERK, JNK et p38 est comparé à celui obtenu dans des cellules adhérant sur un substrat non contraint. (Sawada et al., 2001)

Réponse intégrée

Enfin, la réponse cellulaire aux forces pourrait intervenir de manière intégrée à l'échelle de la cellule tout entière. Des travaux sur l'étalement et la motilité de fibroblastes de souris ont montré que la tension membranaire contrôle la vitesse d'extension d'un lamellipode (Raucher and Sheetz, 2000) : En faisant varier la tension membranaire à l'aide d'un détergent, les auteurs de cet article ont établi que la vitesse d'extension d'un lamellipode est inversement proportionnelle à la tension membranaire. Pour migrer, les cellules ont besoin de pousser leur membrane au front avant et de la rétracter au front arrière. Il doit donc exister dans la cellule des mécanismes qui régulent la tension membranaire lors de la migration. Cette régulation pourrait passer par la transmission de forces au cytosquelette d'actine, ou bien par une régulation de la quantité de membrane disponible via des phénomènes d'exocytose et d'endocytose. Dans le cas de la sensibilité du canal PKD2, par exemple, l'entrée de calcium nécessite un cytosquelette d'actine intact (Alenghat et al., 2004). Les auteurs de ce papier suggèrent que la mécano-sensibilité de ces cellules est liée à une intégration globale des forces au niveau du cytosquelette. Sawada et Sheetz ont d'ailleurs montré que l'application d'une contrainte mécanique sur des cytosquelettes isolés induit le recrutement sur le cytosquelette de protéines comme la paxilline ou la focal adhesion kinase, alors que la distribution d'autres protéines comme la vinculine n'est pas modifiée (Sawada and Sheetz, 2002).

1.5 Cas de *Dictyostelium* : mécano-sensibilité et rôle du calcium

Nous avons vu que les cellules *Dictyostelium discoideum* sont mécano-sensibles et qu'en présence d'un flux elles s'orientent dans la direction de celui-ci suivant une signalisation PI3-kinases dépendante. De plus, leur vitesse augmente. L'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire de 5µM à 1mM augmente encore la vitesse des cellules, d'un rapport 2,5 environ (figure 1.29).

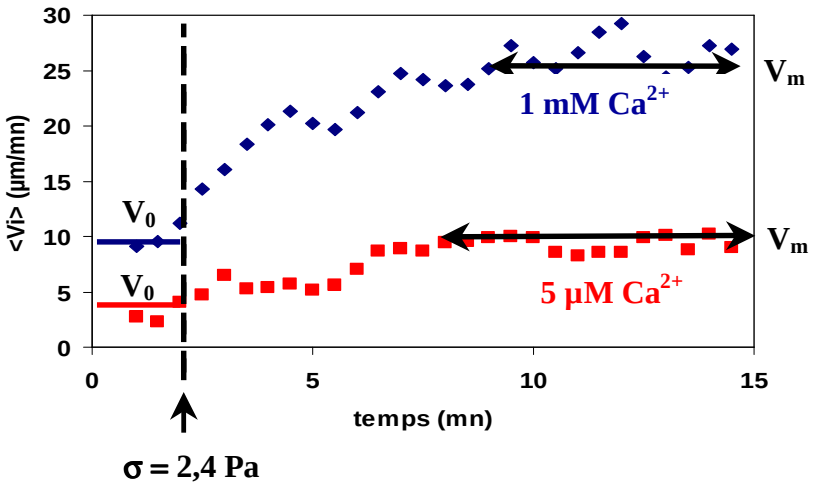


Fig 1.29 : Vitesse instantanée des cellules AX2, à deux concentrations de calcium libre. La contrainte est appliquée deux minutes après le début de l'expérience (flèche simple). V_0 : vitesse à contrainte nulle. V_m : valeur moyenne de la vitesse après la réponse transitoire. D'après (Fache et al., 2005)

En revanche, l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire ne modifie pas l'orientation des cellules. (Fache et al., 2005). Les auteurs ont montré que cet effet était lié à un relargage de calcium depuis les stocks internes, impliquant un récepteur à l'IP3, en réponse à l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule (calcium-induced calcium release). Suite à leurs différentes observations, un schéma des voies de signalisation de la motilité induite par un flux a été proposé (figure 1.30).

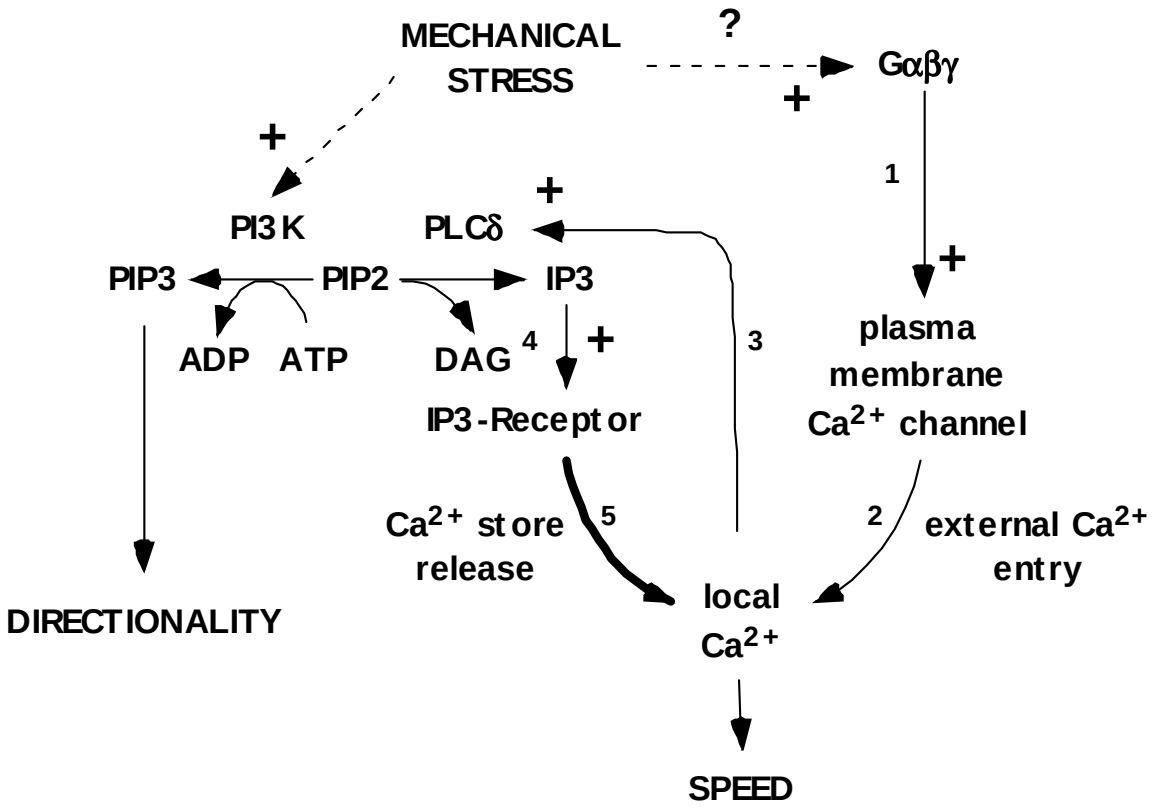


Fig 1.30 : Voies de signalisation induites par un flux chez Dictyostelium. Les différentes voies de signalisation moléculaires stimulées par la contrainte de cisaillement sont représentées, et un schéma est proposé pour les relier entre elles. Voir le texte ci-dessous pour la description du schéma. (Fache et al., 2005)

Dans ce schéma, la contrainte mécanique extérieure serait perçue via un système mécano-senseur non identifié et induirait l'activation de protéines G hétérotrimériques et l'ouverture d'un canal calcique permettant l'entrée de calcium extracellulaire (1 et 2 sur le schéma). L'entrée de calcium activerait la production d'IP_3 (3), qui induirait un relargage de calcium des stocks internes en se fixant sur des récepteurs à l'IP3 existant au niveau de ces réserves de calcium (4 et 5). Cette voie de signalisation contrôlerait la vitesse des cellules, mais pas leur direction, comme on l'a vu. Les auteurs proposent l'existence d'une autre voie de signalisation impliquant les PI3-kinases et régulant la directionalité des cellules (6).

D'autres travaux ont établi l'existence d'une signalisation calcique semblable pour la réponse de cellules *Dictyostelium discoideum* à un gradient chimique d'AMPc, même si l'importance de la réponse calcique dans le chimiotactisme est encore discutée ((Fisher and Wilczynska, 2006), (Traynor et al., 2000)).

Quatre canaux calciques potentiels ont été identifiés suite au séquençage du génome de *Dictyostelium discoideum* ((Wilczynska et al., 2005), figure 1.31).

Channel or pump	DictyBase[a] accession number	Protein product[b]	No. of TM domains[c]	Subcellular location[d]	Functional roles[f]
Channels	DDB0183788	Mucolipin	6	Lysosomes (mucolipin-1), vesicles (mucolipin-3)	Ca^{2+}-dependent lysosomal or vesicle biogenesis and trafficking
	DDB0217079	Polycystin-2	6	Plasma membrane	Mechanosensory Ca^{2+} signaling in cilia
	DDB0201571	IPRL (IP3Receptor-Like protein)	6	ER membrane	Cytosolic Ca^{2+} signaling
	DDB0216059	TPC (Two Pore Channel)	12	Vacuolar membrane	Cytosolic Ca^{2+} signaling

Fig 1.31: Canaux calciques de Dictyostelium discoideum. Les localisations subcellulaires et fonctions des protéines sont prédites d'après celles de protéines homologues existant dans d'autres organismes, sauf pour IPRL dont l'invalidation a été étudiée chez Dictyostelium. (Wilczynska et al., 2005)

Parmi ces canaux, on retrouve le récepteur à l'IP3 dont nous avons parlé plus haut. Les autres gènes identifiés codent respectivement pour des protéines homologues d'une mucolipine, d'un canal TPC (Two Pore Channel), et enfin un homologue du canal PKD2.

Nous avons déjà évoqué le rôle du canal PKD2 dans les cellules rénales humaines. Les mucolipines sont des canaux appartenant également à la famille des TRP. La mucolipine-1, la plus étudiée, participe à la régulation de l'interaction entre endosomes et lysosomes (Piper and Luzio, 2004). TPC1 est un canal calcique présent chez les animaux et les plantes, mais il a été étudié uniquement chez ces dernières. Il se situe au niveau de la membrane de la vacuole et intervient dans la germination et le mouvement du stoma (Peiter et al., 2005). Contrairement à la mucolipine et à PKD2, ce n'est pas un membre de la famille des TRP.

1.6 Objectifs du travail de thèse

L'objectif du travail de thèse est de poursuivre et compléter l'étude réalisée par S. Fache sur les voies de signalisation impliquées dans la motilité induite par un flux chez *Dictyostelium discoideum.*

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étalement de *Dictyostelium discoideum,* et notamment à l'effet du calcium sur cet étalement. S. Fache a montré que l'augmentation du calcium extracellulaire provoquait une augmentation de la surface des protrusions mais pas de leur nombre, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que c'est cette augmentation qui est à l'origine de l'augmentation de la vitesse des cellules. Mais un rôle indirect via les rétractions ne peut être exclu du fait du couplage existant entre protrusions et rétractions lors de la motilité cellulaire.

L'étalement cellulaire est de ce fait un phénomène intéressant à observer car il découple les protrusions et les rétractions : la cellule doit pousser la membrane et s'attacher à la surface pour s'étaler, c'est-à-dire émettre des protrusions, mais n'a pas besoin de se rétracter.

J'ai donc étudié l'étalement de *Dictyostelium discoideum,* en termes de cinétique et de morphologie, en testant l'influence de différents paramètres comme la présence de calcium extracellulaire, l'adhésivité du substrat, ou l'intégrité du cytosquelette d'actine (partie 1 des résultats).

Dans un deuxième temps, afin d'étoffer le modèle de signalisation induite par un flux hydrodynamique proposé par S. Fache, je me suis intéressé à plusieurs protéines pouvant être impliquées dans la motilité induite par un flux :

- d'une part la protéine Phg2, identifiée dans un crible de mutants de phagocytose. Les mutants nuls ont également une motilité sous flux fortement réduite. De manière intéressante, ces cellules sont capables de se développer normalement, ce qui suggère que leur chimiotactisme est peu affecté. J'ai donc voulu au cours de ma thèse comprendre la fonction de cette protéine et de ses différents domaines caractéristiques dans la motilité, en utilisant des cellules phg2Δ et des cellules phg2Δ partiellement complémentées. (partie 2 des résultats)

- d’autre part, pour tenter de découvrir le canal responsable de l’entrée de calcium extérieur dans la cellule, et peut-être de la structure mécano-sensible de *Dictyostelium discoideum*, je me suis intéressé à deux des canaux calciques identifiés précédemment, PKD2 et TPC, dont j’ai inactivé les gènes et étudié le phénotype des mutants nuls obtenus. Nous avons porté notre choix sur ces deux canaux car PKD2 était intéressant au vu des propriétés de ses homologues, et car les homologues de TPC ont été peu étudiés et leur fonction est mal définie en dehors des plantes. Les mucolipines étant mieux connues, et leur rôle putatif au niveau des lysosomes semblant assez éloigné de la motilité cellulaire, nous avons laissé de côté ce gène. (partie 3 des résultats)

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Biologie moléculaire et cellulaire

Dans un premier temps, je vais décrire le matériel biologique dont je me suis servi au cours de ma thèse.

2.1.1 Souches utilisées

J'ai utilisé plusieurs souches cellulaires, les informations concernant celles-ci sont regroupées dans les tableaux 2.1 et 2.2. Les tableaux indiquent pour chaque souche les gènes inactivés, les plasmides insérés, les résistances utilisées pour la sélection et les conditions de culture. Une distinction a été faite entre les souches provenant d'autres laboratoires (tableau 2.1), et celles que j'ai moi-même créées (tableau 2.2). Les différents plasmides et constructions utilisés seront décrits dans les paragraphes suivants.

Souche (et laboratoire d'origine)	**Description**	**Souche parentale**	**Mutagenèse**	**Plasmide inséré**	**Culture**	**Phénotype**	**Réf**
AX2 G. Gerisch	Souche axénique				Suspension HL5		
DH1 P. Cosson	Uracile auxotrophe	AX3	Recombinaison homologue		Boîte, HL5	uracile$^-$	(Gebbie et al., 2004)
phg2Δ P. Cosson	Invalidation du gène phg2	DH1	Mutants d'insertion (REMI)		Boîte, HL5	BlastR uracile$^-$	(Gebbie et al., 2004)
phg2Δ + GFP-Phg2 F.Letourneur	Surexpression de Phg2	phg2Δ		PFL712	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R uracile$^-$	(Blanc et al., 2005)
phg2Δ + GFP-Phg2ΔNter F.Letourneur	Surexpression de $Phg2_{\Delta Nter}$	phg2Δ		PFL726	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R uracile$^-$	(Blanc et al., 2005)
phg2Δ + GFP-Phg2Δkinase F.Letourneur	Surexpression de $Phg2_{\Delta kinase}$	phg2Δ		PFL739	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R uracile$^-$	(Blanc et al., 2005)
phg2Δ + GFP-Phg2ΔRBD F.Letourneur	Surexpression de $Phg2_{\Delta RBD}$	phg2Δ		PFL741	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R uracile$^-$	(Blanc et al., 2005)

Tableau 2.1 : Différentes lignées de Dictyostelium discoideum utilisées. HL5 correspond au milieu de culture liquide de Dictyostelium discoideum. BlastR et G418R indiquent respectivement une résistance à la blasticidine et à la généticine (G418).

Souche	Description	Souche parentale	Mutagenèse	Plasmide inséré	Culture	Phénotype
pkd2Δ	Invalidation du gène pkd2	AX2	Recombinaison homologue		Suspension, HL5	BlastR
tpcΔ	Invalidation du gène tpc	AX2	Recombinaison homologue		Suspension, HL5	BlastR
AX2 + GFP-PKD2	Surexpression de GFP-PKD2	AX2		PDXA-GFP-PKD2	Suspension, HL5 + 20µg/ml G418	G418R
pkd2Δ + GFP-PKD2	Surexpression de GFP-PKD2	pkd2Δ		PDXD-GFP-PKD2	Suspension, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R
DH1 + CRAC-GFP	Surexpression de PH_{CRAC}-GFP	DH1		Crac-GFP	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	G418R
phg2Δ + CRAC-GFP	Surexpression de PH_{CRAC}-GFP	phg2Δ		Crac-GFP	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R
DH1 + $LimE_{\Delta cc}$ -GFP	Surexpression de $LimE_{\Delta cc}$ -GFP	DH1		$LimE_{\Delta cc}$ -GFP	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	G418R
phg2Δ + $LimE_{\Delta cc}$ -GFP	Surexpression de $LimE_{\Delta cc}$ -GFP	phg2Δ		$LimE_{\Delta cc}$ -GFP	Boîte, HL5 + 20µg/ml G418	BlastR, G418R

Tableau 2.2 : Lignées de Dictyostelium discoideum créées au cours de la thèse. HL5 correspond au milieu de culture liquide de Dictyostelium discoideum. BlastR et G418R indiquent respectivement une résistance à la blasticidine et à la généticine (G418).

2.1.2 Plasmides et constructions utilisés

- **CRAC-GFP** : plasmide à réplication autonome contenant le domaine PH (Pleckstrin homology) de CRAC (cytoplasmic regulator of adenylyl cyclase), en fusion avec la GFP. Ce domaine se lie au PIP_3 *in vivo*. Le plasmide contient des gènes de résistance à l'ampicilline (sélection *E.coli*) et à la généticine (sélection *D.discoideum)*. Ce plasmide provient du laboratoire de P. Devreotes (*Johns Hopkins University, Baltimore, USA*)
- **$LimE_{\Delta cc}$ -GFP**: plasmide à réplication autonome contenant le gène codant pour la protéine LimE, dépourvu de son domaine C-terminal (domaine coiled-coil), en fusion avec la GFP. LimE s'associe *in vivo* aux filaments d'actine nouvellement créés, marquant ainsi le front avant des cellules motiles, où l'actine polymérise. Le plasmide

contient des gènes de résistance à l'ampicilline et à la généticine. Ce plasmide provient du laboratoire de G. Gerisch *(Max Planck Institut, Martinsried, Allemagne).*

- **pFL712, pFL726, pFL739, pFL741**: constructions réalisées à partir du vecteur PDXA-GFP2 **(Levi et al., 2000)** contenant des gènes de résistance à l'ampicilline et à la généticine, ainsi que le gène codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur de l'actine. Différents fragments du gène Phg2 ont été insérés entre les sites BamHI et XhoI de ce vecteur, la GFP se trouvant toujours à l'extrémité N-terminale de ces fragments (figure 2.1).
    - pFL712, Phg2 complet
    - pFL726, Phg2 sans le domaine N-terminal de liaison au PIP_2
    - pFL739, Phg2 sans le domaine kinase
    - pFL741, Phg2 sans le domaine de liaison à Ras

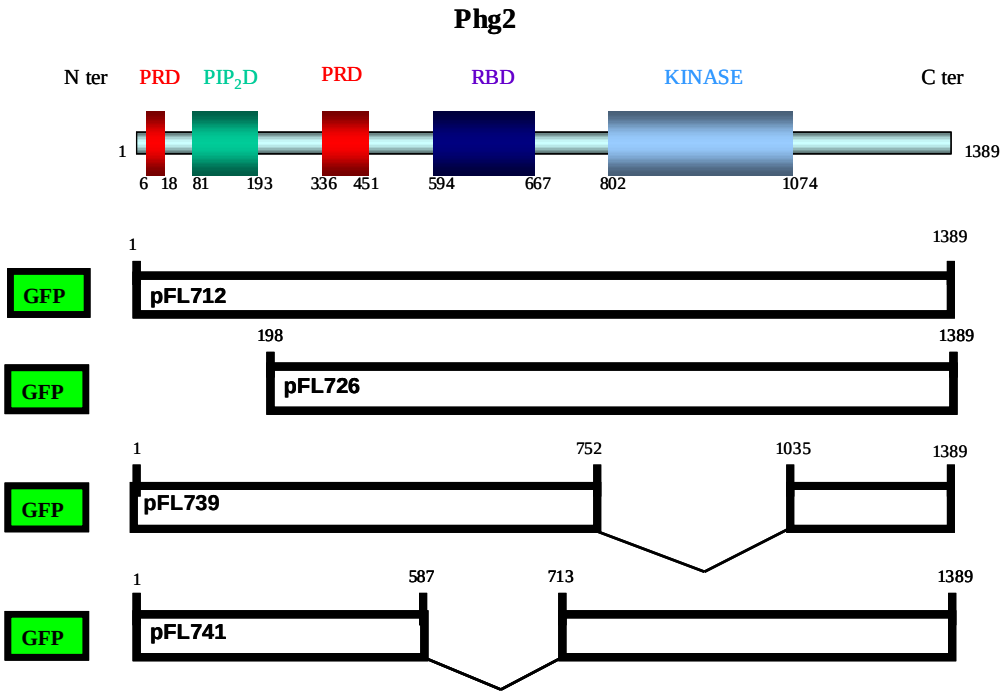


Figure 2.1 : Structure de Phg2 et fragments surexprimés dans les cellules phg2Δ: PIP2D : domaine de liaison au PIP2, PRD : Prolin Rich Domain, RBD : Ras Binding Domain, KINASE : domaine sérine thréonine kinase.

Enfin, les constructions concernant pkd2 et tpc (invalidation et surexpression), que j'ai réalisées moi- même, sont décrites dans le prochain paragraphe :

2.1.3 Sous-clonage

- **Obtention de mutants d'invalidation pkd2Δ et tpcΔ (figure 2.2):**

Les souches invalidées pour les gènes pkd2 et tpc ont été obtenues par recombinaison homologue. Pour chaque gène, deux fragments d'ADN génomique de la souche sauvage AX2, distants d'au moins 100 paires de bases (pb) et longs d'environ 300pb ont été amplifiés par PCR à partir d'oligonucléotides contenant des sites de restriction pour EcoRV, EcoRI et XbaI, voir figure 2.3 pour le détail. Ces fragments ont été introduits dans un plasmide (pBluescript KS+), en intercalant une cassette de 1,3kb codant pour un gène de résistance à la blasticidine (cassette BsR). La construction a été amplifiée dans *E.coli* (souche Xl1 Blue), linéarisée, et 30µg d'ADN ont été introduits dans les cellules *Dictyostelium discoideum* par électroporation. Après recombinaison homologue, la portion de gène comprise entre les deux fragments amplifiés est remplacée par la cassette BsR. Les cellules ayant intégrées la cassette sont sélectionnées par la blasticidine. Par PCR, on vérifie ensuite que le gène d'intérêt est bien interrompu.

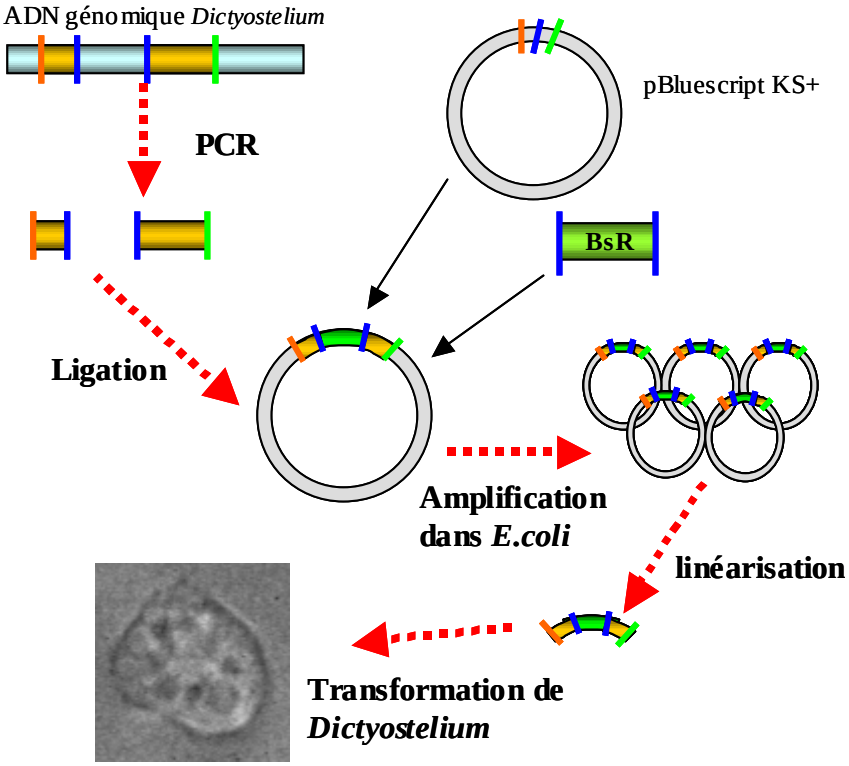
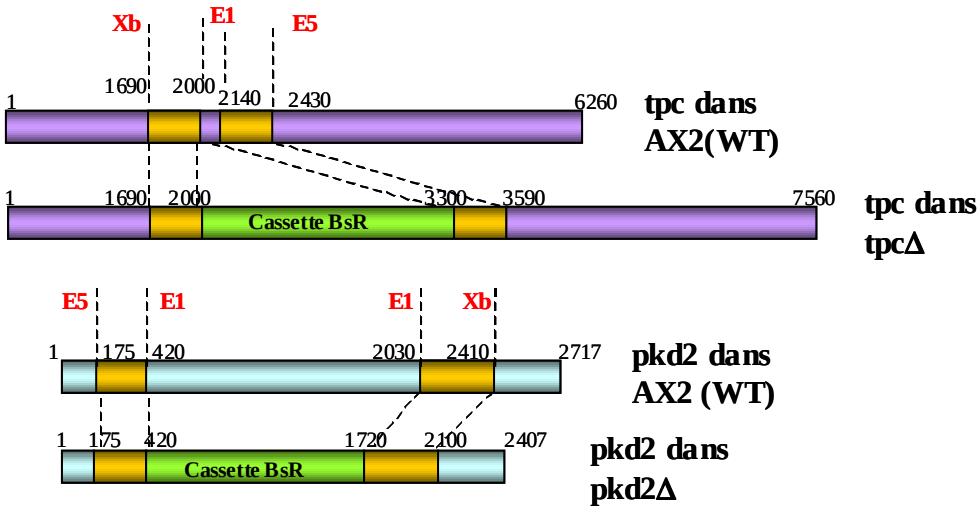


Figure 2.2 : Stratégie pour l'obtention de mutants d'invalidation chez Dictyostelium discoideum. Le protocole est décrit dans le texte.



Figures 2.3 : Gènes et fragments de gènes correspondants aux constructions d'invalidation de pkd2 et tpc. Les sites de restriction utilisés sont indiqués en rouge : E1 = EcoRI, E5 = EcoRV, Xb = XbaI.

- **Obtention de mutants de surexpression (pkd2-GFP)**

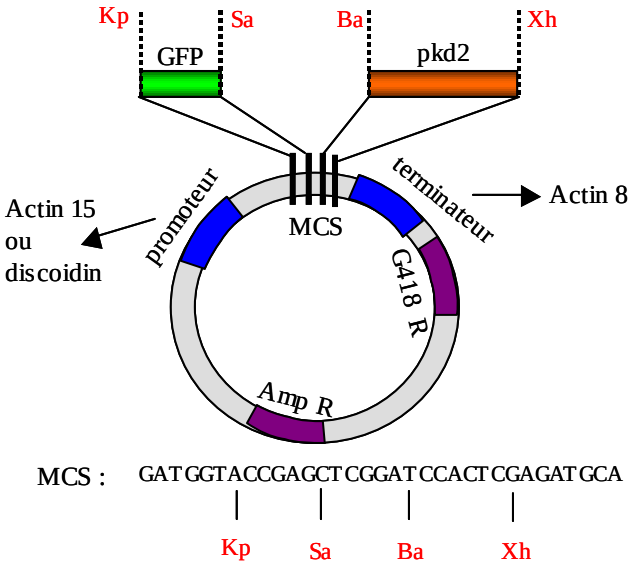


Fig 2.4 : Plasmide de surexpression de GFP-pkd2. MCS = Multiple Cloning Site. Les sites de restriction utilisés sont indiqués en rouge : Ba =BamHI, Kp = KpnI, Sa = SacI, Xh = XhoI.

Le gène pkd2 a été amplifié en entier par PCR à partir d'ADN génomique de la souche sauvage AX2, séquencé, puis inséré dans un plasmide PDXD ou PDXA contenant la GFP à son extrémité N-terminale. Ces plasmides contiennent des gènes de résistance à l'ampicilline et à la généticine, et le promoteur amibien de la discoidine (PDXD) ou de l'actine (PDXA) en amont de la GFP. Les plasmides obtenus ont été introduits dans les cellules *Dictyostelium* par électroporation, en même temps que le plasmide pREP qui permet leur réplication

extrachromosomale. La surexpression de tpc n'a pas été réalisée, car son gène, très long, s'est avéré très difficile à amplifier par PCR.

2.1.4 Techniques de biologie moléculaire

Les constructions sont réalisées en utilisant des outils classiques de biologie moléculaire, que je ne vais pas décrire ici. Je m'en tiendrai à quelques remarques propres à *Dictyostelium discoideum* concernant les protocoles :

- Préparation d'ADN génomique de Dictyostelium discoideum pour les PCR :

10^7 cellules sont lavées en tampon 12mM NaK/Pi (1,66 g/L de NaH_2PO_4, pH ajusté à 6,1 par ajout de KOH) puis reprises dans 100µl d'eau et 100µl de tampon de lyse 2X (concentration finale 50mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM EDTA pH 7,2, 3% SDS, 1% β-mercapto-éthanol). La lyse cellulaire s'effectue dans un premier temps au micro-onde (15,10 et 5 secondes à la puissance maximale) puis dans un second temps à 75°C pendant 10mn après ajout de 200µl de tampon de lyse 1X. On ajoute ensuite 400µl de Tris 20mM pH 9,5 et 500µl de phenol-chloroforme pour faire précipiter les protéines, puis on centrifuge (5mn à 20 000*g, 4°C). L'ADN reste en phase aqueuse. On reprend la phase aqueuse, on rajoute à nouveau 400µl de phenol-chloroforme et on recentrifuge. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 400µl d'isopropanol et 20µl d'acétate de sodium 3M pH 4,7. Après 1h à –20°C, l'ADN est centrifugé 10mn à 20 000g puis lavé avec 750µl d'éthanol 70%. Après séchage, l'ADN est repris dans 40µl de TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 7,2) additionné de 0,5µl de RNase A.

- PCR :

Les PCR ont été effectuées en utilisant la Taq polymérase (taux d'erreur 2.10^{-5}). Le génome de *Dictyostelium discoideum* étant très riche en A et T, j'ai dû fortement diminuer la température d'élongation (68°C en général).

- Transformation de *Dictyostelium* :

Les cellules sont transformées par électroporation : $5*10^7$ cellules sont diluées dans 200ml de tampon d'électroporation à 0°C (K_2HPO_4 1,2mM, KH_2PO_4 9,5mM, 50mM sucrose, pH 6,2),

centrifugées (1000*g, 4mn, 4°C), lavées deux fois, et reprises dans le tampon d'électroporation froid à une concentration de $1,1*10^7$ cellules/ml. $4*10^6$ cellules sont prélevées, mises en présence de 30µg du plasmide d'intérêt, et soumises à deux décharges d'un condensateur de 3µF chargé à 1000V (constante de temps ≈ 2ms). Les cellules récupèrent ensuite pendant 24h dans du milieu HL5, puis l'antibiotique pour la sélection est ajouté (20µg/ml de G418 ou 7,5µg/ml de blasticidine suivant les cas). Les clones sont visibles au bout d'une semaine environ.

2.1.5 Modes de culture et milieu nutritif

Pour les expériences liées à la motilité induite par un flux, à l'étalement et à l'adhésion cellulaire, nous utilisons des amibes *Dictyostelium discoideum* en phase végétative, c'est à dire dans l'état unicellulaire. Il faut pour cela que le milieu environnant soit suffisamment riche en nourriture et en oxygène, sinon les cellules rentrent dans leur cycle de développement et de différentiation.

La culture cellulaire est réalisée dans un milieu nutritif liquide (HL5, dont la composition est donnée dans le tableau 2.3) assurant l'apport en acides aminés, sucres et sels. Les souches cellulaires utilisées sont axéniques, c'est-à-dire qu'elles possèdent trois mutations leur permettant de se nourrir par pinocytose, alors que la souche d'origine ne peut se nourrir que par phagocytose. Un antibiotique est également ajouté afin de limiter les contaminations du milieu de culture.

Les cellules sont très sensibles à la température. La température optimale est de 21°C, et si on s'éloigne de cette valeur de plus de quelques degrés, la pousse des cellules est fortement altérée. C'est pourquoi la pièce de culture et la salle contenant nos montages expérimentaux sont climatisées.

Nous utilisons deux types de support pour la culture cellulaire :

- Culture sur boîte de Pétri : les cellules adhèrent et se multiplient au fond de la boîte. La hauteur de liquide est de quelques millimètres ; ceci assure une bonne oxygénation des cellules. La concentration des cellules est contrôlée (10^6 cellules par mL de milieu) en diluant régulièrement les boîtes afin que les cellules restent non confluentes. Pour diluer les cellules, on les resuspend dans la boîte et on remplace les 9/10 de la suspension par du milieu frais.
- Culture en suspension : on utilise des erlenmeyers que l'on remplit entre 1/15ème et 1/7ème du volume total. Le milieu de culture et les cellules sont placés sur un

agitateur giratoire, et agités à environ 180 rotations par minute, afin d'oxygéner le milieu. On dilue régulièrement les cellules pour que la concentration soit comprise entre 10^6 et 10^7 cellules/mL (phase de croissance exponentielle).

Produits	Concentration massique (g/L)
Peptone	14,30
Extrait de levure	7,15
Maltose	18,00
Na_2HPO_4, $12H_2O$	1,28
KH_2PO_4	0,48
Dihydrostreptomycine sulfate	0,25

Tableau 2.3 - Composition du milieu nutritif HL5 pour la culture de Dictyostelium discoideum

2.1.6 Mesure de la concentration cellulaire

Pour mesurer la concentration cellulaire dans les boîtes ou les erlenmeyers, on utilise un compteur de particules (*Beckman Coulter Z2*). Cet appareil mesure le nombre de particules dans un volume de liquide donné, et donne la distribution de leur taille. La figure 2.5 montre une distribution de tailles de cellules AX2. Elle suit une loi log normale. Le pic est centré autour de 10 µm, qui est la taille caractéristique des cellules *Dictyostelium discoideum*. En phase de croissance exponentielle, la concentration cellulaire double en 8 à 10 heures environ.

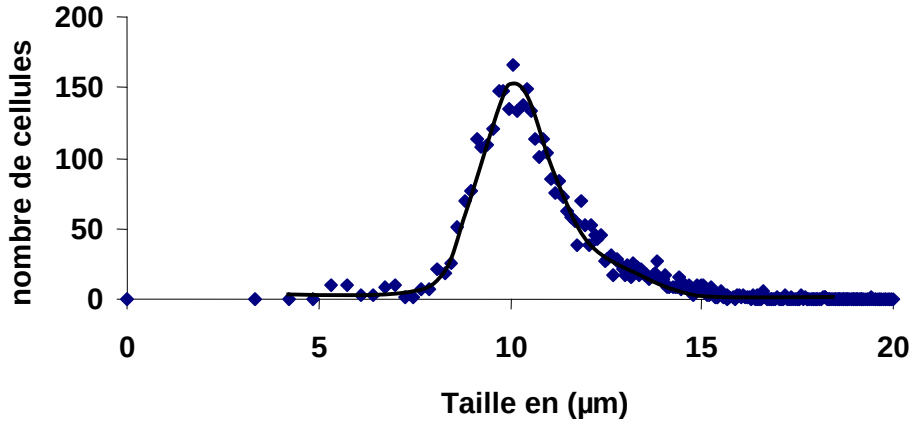


Fig 2.5 : Cellules AX2 : distribution de tailles ajustée par une loi log normale

2.1.7 Préparation des cellules

Pour les expériences de motilité et d'étalement, les cellules sont resuspendues dans un milieu non nutritif incolore, le tampon de Sörensen (tampon SB, voir tableau 2.4 pour la composition).
On prélève des cellules en culture dans le milieu HL5, on les centrifuge (centrifugeuse *Beckman GPKR centrifuge*) pendant 3 minutes à 1000*g. On les rince une fois avec du tampon SB puis on les centrifuge à nouveau 3 minutes à 1000*g. On resuspend finalement le culot en tampon SB à la concentration voulue.

Produit	Concentration volumique (mM)
Na_2HPO_4	2
KH_2PO_4	14,5

Tableau 2.4 - *Composition du tampon Sörensen, le pH final est 6,2*

2.2 Traitement des surfaces

Le mouvement, l'étalement ou l'adhésion cellulaire sont étudiés sur des surfaces de verre. Suivant les besoins, nous avons utilisé des lames porte-objet (*Esco*, 75 x 25 mm²), et des plaques de verre (*Bio-Rad*, 105 x 85 mm²), de 1 mm d'épaisseur, ainsi que des lamelles couvre-objet (*Menzel-Glaser*, 25 x 60 mm²) et des chambres sur lamelles *Lab-Tek* à 8 puits (*Nunc*), de 150 µm d'épaisseur.
Les lames et lamelles sont initialement lavées avec un détergent ionique, rincées à l'eau distillée, puis immergées dans une solution de soude à 14,5 M pendant 5 minutes, pour rendre la surface bien hydrophile. Elles sont ensuite soigneusement rincées à l'eau distillée, séchées à l'air comprimé puis stockées dans une boite pour éviter le dépôt de poussière, et utilisées dans la journée. Les chambres *Lab-Tek* sont uniquement remplies de soude 14,5 M pendant 5 minutes et rincées à l'eau distillée.
Pour certaines expériences, les lames sont recouvertes de 3-AminoPropyltriethoxySilane (APS, *Sigma*), molécule qui augmente l'adhérence de *Dictyostelium* d'un facteur 4 (Decave et al., 2002). Les lames ou lamelles de verre traitées à la soude et rincées sont placées pendant 20mn dans une solution d'APS (1% d'APS et 5mM d'acide acétique dans de l'eau distillée).

Elles sont ensuite plongées 5mn dans de l'eau distillée, rincées à nouveau à l'eau distillée, et séchées à l'air comprimé. Elles sont enfin placées dans un four à 100°c pendant 15mn (stabilisation du silane), puis stockées à température ambiante et utilisées dans la journée. Pour les chambres *Lab-Tek*, on détache la lamelle qui supporte la chambre et on la remplace par une lamelle traitée à l'APS comme ci-dessus, que l'on colle à l'aide d'adhésif double face.

2.3 Mesure de la cinétique de l'étalement cellulaire et de la dynamique des zones de contact

Les expériences d'étalement cellulaire consistent en l'observation de la croissance des zones de contact cellule-substrat lors de la sédimentation de cellules sur une lamelle de verre. Elles permettent d'étudier la réponse d'une cellule au contact d'une surface, et les premières étapes de la motilité cellulaire (émission de protrusions).

2.3.1 Protocole expérimental

Pour visualiser l'étalement cellulaire, nous utilisons un microscope inversé *Olympus IX 71*, muni d'un objectif à immersion de grossissement 60x. Cet objectif nous impose de travailler avec des lamelles à 8 puits (*Lab-Tek, chambered coverglass system*), car sa focale est de 0,17 millimètres. Chaque puit a une surface de 80 mm² et une contenance de 600 µl. On peut ainsi faire huit observations successives avec une lamelle. La mise au point se fait sur la surface de la lamelle pour visualiser l'évolution de la surface de contact cellule-substrat.
Les cellules sont reprises en SB à une concentration de 5.10^5 cellules/mL et placées en agitation. Les cellules sont gardées ainsi une heure au plus, car ce milieu étant non nutritif, les cellules commencent à se différencier. Pour chaque expérience, on dépose 300 µL de la suspension de cellules dans un des puits. L'expérience est suivie grâce à une caméra numérique intensifiée (*Photonic Science*) commandée par ordinateur via le logiciel *Image Pro Plus* (*Media Cybernetics*).

Sauf indication contraire, les images sont prises à une seconde d'intervalle pendant 5mn pour chaque expérience.

Notre microscope nous permet de réaliser trois types d'observations :

- Illumination en contraste de phase (voir figure 2.6) : observation en lumière transmise de cellules individuelles. On voit le contour cellulaire et les organelles. Le contraste de phase permet d'observer les changements morphologiques de la cellule (taille, activité des organelles, déformation de la membrane, polarisation, etc…).

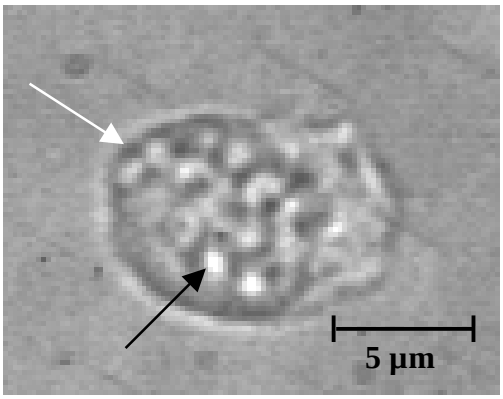


Fig 2.6 : une cellule observée au grossissement 60x, en contraste de phase : on distingue le contour cellulaire et des vésicules (flèches blanches et noires).

- En fluorescence : grâce à une lampe à vapeur de mercure et à un jeu de filtres, on peut notamment imager des cellules exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP). (λ_{ex} = 481 nm, λ_{em} = 507 nm)

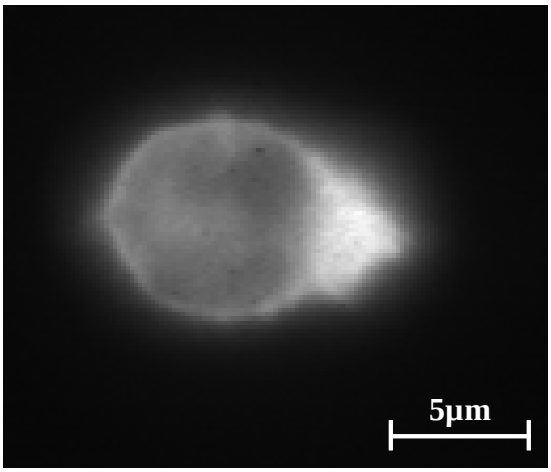


Fig 2.7 : Fluorescence d'une cellule DH1 exprimant LimE$_{\Delta cc}$-GFP, observée au grossissement 60x.

- En RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) : cette technique nous permet d'étudier l'évolution de la surface de contact entre une cellule et une surface. Un schéma du montage optique est donné en figure 2.8. Nous allons le décrire en détail dans le prochain paragraphe.

2.3.2 RICM

On utilise la lumière d'une lampe à vapeur de mercure filtrée à la longueur d'onde λ = 546 nm. Le faisceau est dirigé sur l'échantillon (figure 2.8A). Une partie du faisceau est réfléchie à l'interface avec le substrat, l'autre à l'interface avec l'objet à observer. La technique consiste à observer l'intensité lumineuse résultant de l'interférence entre ces deux rayons. Un dispositif anti-retour, constitué d'un ensemble polariseur-analyseur croisés, permet de s'affranchir autant que possible des réflexions parasites sur l'optique qui affectent le contraste des interférences.

L'intensité I résultant des interférences entre les rayons d'intensité I_1 et I_2 (figure 2.8A) dépend de la différence de chemin optique entre ces rayons, donc de la distance h entre le substrat et l'objet à observer. Il faut également rajouter une différence de marche de $\lambda/2$ induite par la réflexion du rayon I_1, provenant d'un milieu incident de fort indice (verre) sur un milieu d'indice plus faible (eau). La surface de contact avec le substrat apparaît alors en noir car les interférences sont destructrices pour h = 0. Lorsque la surface de l'objet s'éloigne du substrat, on observe une alternance de franges noires et de franges blanches caractéristiques du profil de l'objet (figure 2.8B). En pratique, on observe facilement la première frange blanche, mais rarement les suivantes.

La mise au point se fait à l'aide d'un diaphragme : les bords de ce dernier apparaissent nets quand le point focal est au niveau de la surface d'adhésion.

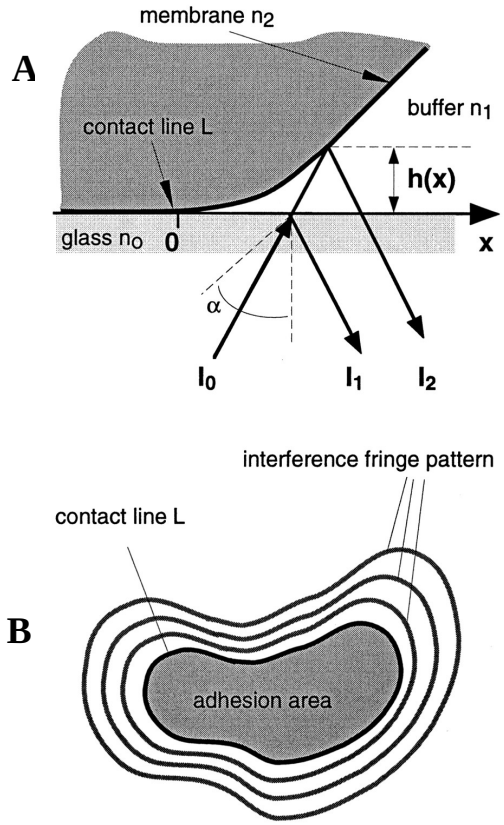


Fig 2.8 : ***A :*** *Principe du dispositif d'observation en RICM : On observe les interférences entre les rayons réfléchis par le substrat et par la membrane de la cellule. La différence de marche entre ces rayons est relié au profil de la membrane h(x).* ***B :*** *Schéma représentant l'image obtenue : La surface de contact apparaît en noir, entourée de franges d'égale épaisseur (Simson et al., 1998).*

La figure 2.9 montre des images typiques obtenues en RICM. On y voit une cellule en train de sédimenter : la surface de contact (zone sombre) augmente en fonction du temps. Pour améliorer le contraste des films, on enregistre à chaque début d'expérience une image de fond. On soustrait cette image aux films, en rajoutant 50 à la valeur de chaque pixel pour conserver des valeurs positives. On ajuste ensuite le contraste et la luminosité des images, pour distinguer au mieux zones sombres (zones de contact) et zones claires (fond lumineux). Enfin, on applique un filtre passe bas pour diminuer le bruit de l'image.

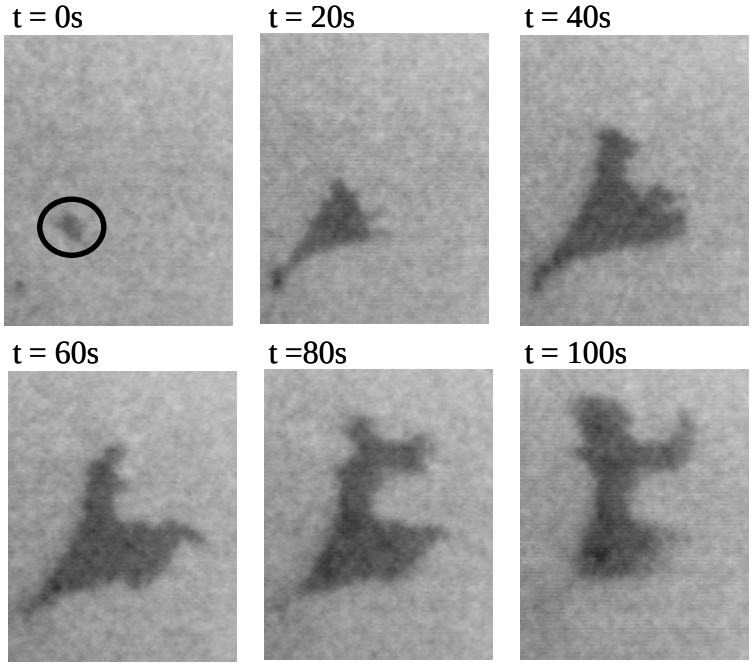


Fig 2.9 : Sédimentation d'une cellule AX2 en fonction du temps. L'origine des temps est définie lorsque apparaît le premier contact cellule-substrat (zone entourée).

On ne sélectionne que les cellules qui n'entrent pas en contact avec d'autres au cours du film. Un programme permet de déterminer l'aire de contact entre la cellule et le substrat à chaque image, et on obtient ainsi une courbe donnant l'aire de contact A(t) en fonction du temps.

2.3.3 Analyse statistique de l'étalement cellulaire

On peut également obtenir des informations sur la morphologie des cellules à partir des films, en s'intéressant par exemple à la surface et à la localisation des aires gagnées entre deux images, des aires perdues entre deux images, et des aires stables entre deux images. C'est le but de la procédure que nous allons décrire maintenant, qui a été mise au point au laboratoire. On commence par séparer la zone de contact cellule-substrat (colorée en blanc) du reste de l'image (en noir). Puis on découpe chaque image en trois zones (gagnée, perdue et stable) que l'on peut analyser séparément.

Extraction des contours des zones de contact cellule-substrat

On commence par segmenter les images : les pixels dont l'intensité est en dessous d'une valeur donnée sont transformés en pixels blancs, et le reste de l'image en pixels noirs.

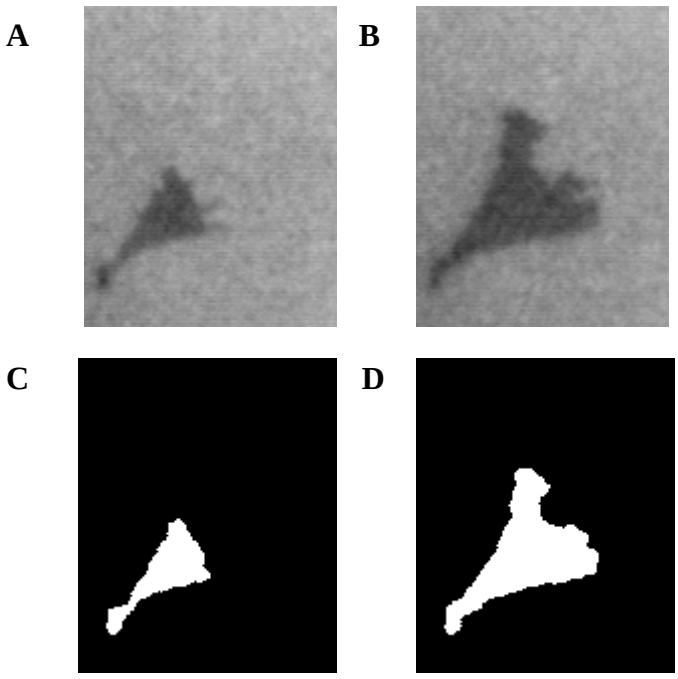


Fig 2.10 : *A et B, images brutes de la même cellule AX2 à 20 secondes d'intervalle. C et D, images A et B segmentées*

La fonction *count* du logiciel Image Pro Plus permet de régler le seuil entre le fond et la zone de contact cellule-substrat, et ainsi détecter le bord cellulaire. La détermination du seuil peut se faire de manière automatique. On obtient alors des images codées sur 256 niveaux de gris, où la zone de contact, sombre en RICM, est en blanc (valeur de pixel = 255) et le fond, clair en RICM, en noir (valeur de pixel = 0).
Sur la figure 2.10, on voit deux cellules, avant (A et B) et après la segmentation (C et D).

Détermination des aires gagnées et perdues

Les zones de gains ou de pertes de surface sont définies comme les aires où la luminosité augmente de 0 à 255, ou diminue de 255 à 0 respectivement entre deux images. Il y a également une partie invariante, où la luminosité reste constante. Mathématiquement, on définit ces différentes zones en utilisant l'équation suivante :

$$F_i = \frac{p_i - p_{i-3}}{6} + 127 + \frac{p_i}{255}$$

où p_i est la luminosité d'un pixel au temps t_i. Les aires gagnées, perdues et invariantes correspondent à F_i = 170, 86 ou 128 respectivement, et le fond à 127. $(p_i-p_{i-3})/6$ correspond à

la moyenne glissante de $(p_i-p_{i-1})/2$ (différence de valeur de pixel entre 2 images) sur 3 images. On rajoute 127 pour toujours avoir des valeurs positives et $p_i/255$ pour distinguer les zones invariantes du fond des zones invariantes de la zone de contact. Les valeurs de pixels utilisées pour séparer les zones sont donc des moyennes sur 3 images, pour diminuer le bruit lié à la segmentation sur le contour de la cellule. Le programme crée un fichier vidéo en trois couleurs en fonction de ces valeurs : les aires gagnées, perdues et invariantes entre deux images sont respectivement bleues, rouges et vertes.

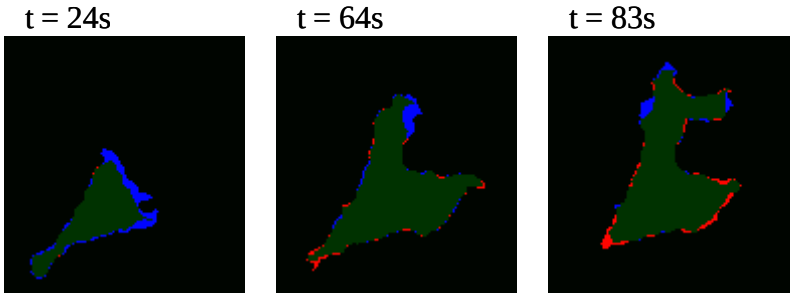


Fig 2.11 : Images trois couleurs de l'étalement d'une cellule AX2. Zones invariantes en vert, aires gagnées en bleu, aires perdues en rouge.

Le programme calcule ensuite les gains et pertes en surface des bords cellulaires avant et arrière, entre deux images consécutives. On a donc accès à l'évolution de la surface gagnée (que l'on appellera **protrusions**) ou perdue (que l'on appellera **rétractions**) pendant le mouvement. On peut ainsi relier un pic sur le graphe à l'apparition d'une aire colorée sur le bord cellulaire. La figure 2.11 nous montrent 3 images d'un film 3 couleurs. Elles correspondent au graphe de la figure 2.12.

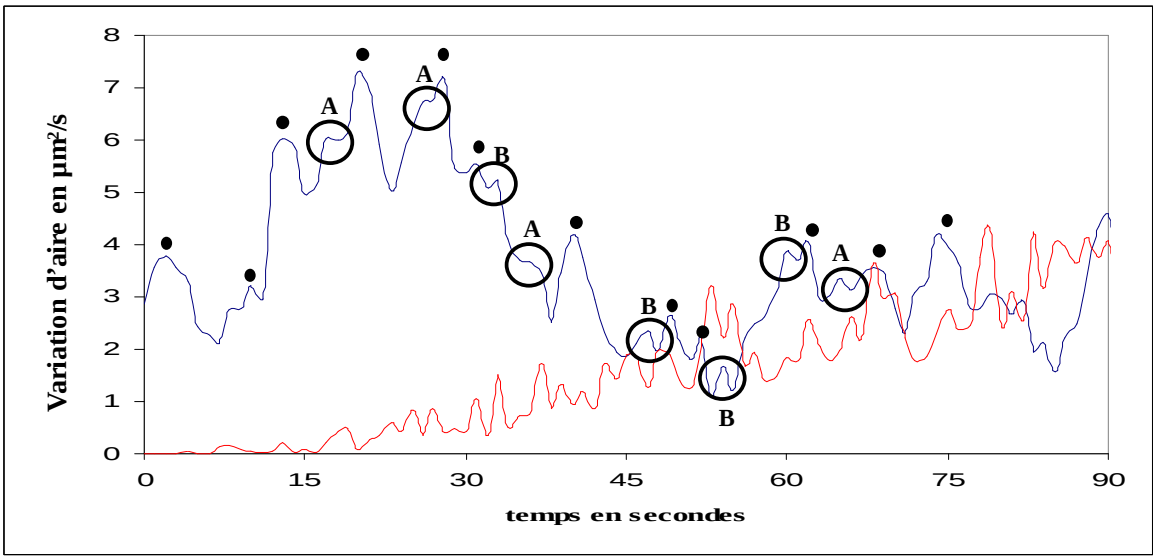


Fig 2.12 : Courbes de gain (protrusions, bleue) et de perte (rétractions, rouge) de surface de contact de cellules AX2 lors de l'étalement. On repère les protrusions et les rétractions comme les pics de la courbe de gain ou de perte. Ces courbes correspondent à l'enregistrement complet de la cellule montrée sur la figure 2.11. Les points noirs correspondent à des pics jugés significatifs. Les pics entourés sont négligés suivant les critères A et B décrits dans le paragraphe ci-dessous.

Détermination de la taille et de la fréquence des protrusions et des rétractions

A partir des courbes ainsi traitées, on peut déterminer la taille et la fréquence des protrusions et des rétractions. Pour les courbes individuelles, l'analyse procède en trois temps :

1. On détecte la position et la valeur des extrema locaux et on les classe en maxima et minima
2. On trie les données relevantes :

- Si la hauteur d'un maximum par rapport au minimum précédent ou suivant est inférieure à 0,15 µm²/sec, ce qui correspond au bruit de fond, on néglige ce pic (cas A sur la figure 2.12).
- Si l'intervalle de temps entre deux pics consécutifs est inférieur ou égal à deux fois le temps d'échantillonnage (soit un intervalle de temps inférieur ou égal à deux secondes), on néglige le plus petit des pics (cas B sur la figure 2.12).

3. On calcule les moyennes et distributions des périodes (distance entre pics consécutifs) des pics.

Par exemple, pour la figure 2.12, on retient les pics aux temps 2, 10, 13, 20, 28, 31, 40, 48, 52, 62, 68 et 74s, ce qui donne une période moyenne entre pics de 6,5 ± 2,3s.

2.4 Expériences de motilité sous flux à faible grossissement : Détermination statistique de la vitesse et de l'orientation des cellules

Le but de ces expériences est d'étudier la vitesse et l'orientation instantanées moyennes de cellules soumises à un écoulement hydrodynamique appliquant une contrainte de cisaillement contrôlée. Ces expériences nous donnent des informations statistiques sur la motilité des cellules au niveau macroscopique, mais n'apportent pas d'information sur la morphologie des cellules en mouvement. On peut contrôler un certain nombre de paramètres influant sur la réponse des cellules, au niveau :

- physico-chimique : la contrainte hydrodynamique, la concentration d'espèces chimiques présentes dans le tampon, en particulier l'ion calcium.
- biologique : lignées cellulaires obtenues en invalidant ou en surexprimant certains gènes.

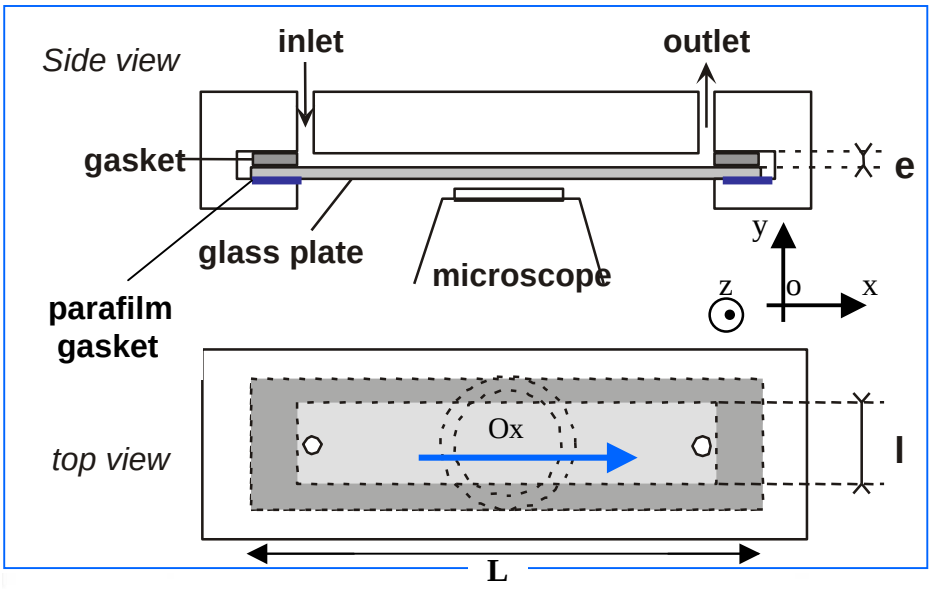
Nous allons d'abord détailler le dispositif expérimental, puis expliquer comment sont exploitées et traitées les données obtenues lors de ces expériences de motilité sous flux.

2.4.1 Chambre à flux latéral à lame

Cette chambre (Fig. 2.13) 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 180 µm. il y a également un joint en parafilm sous la lame, pour éviter les fuites. Les trous à chaque extrémité du couvercle permettent l'arrivée et l'évacuation du fluide. Le débit, symétrique dans la direction *Ox*, est contrôlé par la différence de hauteur du fluide entre un réservoir supérieur et un réservoir inférieur.

La chambre est transparente et laisse donc passer la lumière qui vient du haut. Les cellules sont observées à travers la lame grâce à un microscope inversé *Zeiss 415* équipé d'un objectif 2.5x, avec illumination en fond noir. Le mouvement des cellules est enregistré par une caméra numérique (*SP-Eye Photonic Science*) via le logiciel d'acquisition et de traitement d'images *Image Pro Plus* (*Media Cybernetics*).

A



B

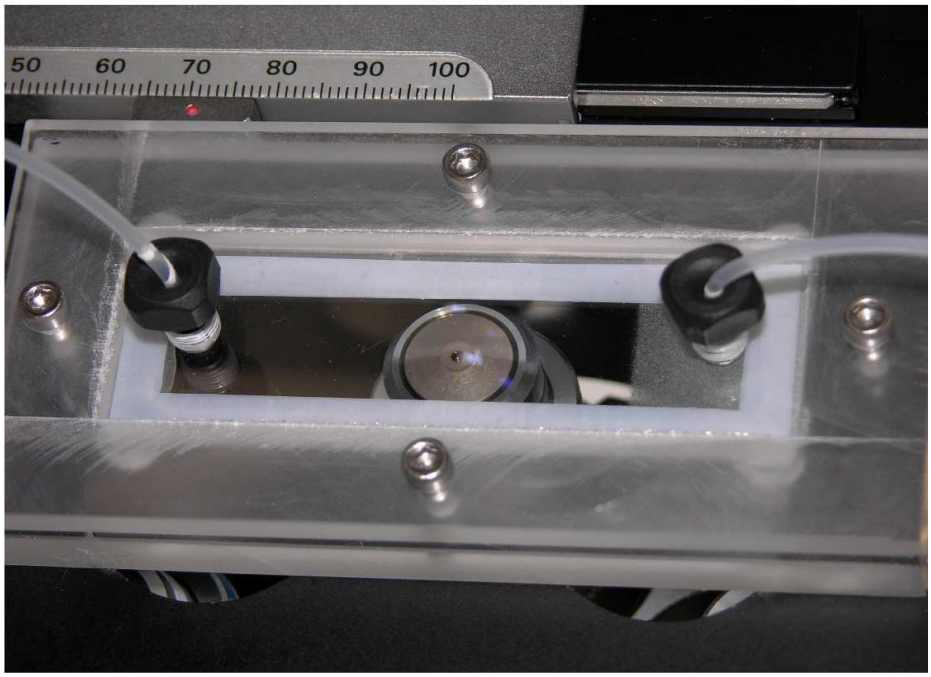


Fig. 2.13 : Représentation schématique (A) et photographie (B) de la chambre à flux latéral.

Dans la chambre, les cellules qui adhèrent au substrat sont soumises à une contrainte de cisaillement 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.

2.4.2 Calcul de la contrainte appliquée aux cellules

Dans la chambre, les cellules adhérentes subissent l'action des forces exercées par le fluide. On caractérise cette action mécanique par la contrainte à la paroi σ exercée par le fluide. Nous allons déterminer σ grâce à l'équation de Navier Stokes pour un fluide incompressible :

$$\rho\frac{\partial\vec{v}}{\partial t}+\rho\vec{v}.\vec{\nabla}\vec{v}=-\vec{\nabla}p+\eta\Delta\vec{v}$$

On remarque que la largeur *l* et la longueur *L* de la chambre sont très grandes devant l'épaisseur *e* (voir la figure 2.13). On peut donc se ramener à un écoulement suivant x entre deux plaques planes, parallèles et infinies suivant Ox et Oy. Dans cette approximation, on a $\vec{v}(\vec{r})=v(z)\vec{e}_x$, donc $\vec{v}.\vec{\nabla}\vec{v}=\vec{0}$, et l'équation de Navier Stokes se simplifie, en régime stationnaire ($\frac{\partial\vec{v}}{\partial t}=\vec{0}$), en

$$\eta\frac{\partial^2 v}{\partial z^2}=\frac{dP}{dx}$$

avec les conditions aux limites v(z = 0) = v(z = e) = 0. La solution de l'équation est de la forme

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

On peut déterminer k en le reliant à une grandeur physique mesurable expérimentalement, par exemple le débit volumique :

$$\mathrm{D}=\int_{\substack{\text{section}\\\text{chambre}}}\vec{\mathrm{v}}.\mathrm{d}\vec{\mathrm{S}}$$

soit, sur une section transverse de la chambre de hauteur e et de largeur l :

$$D=\int_{-l/2}^{l/2}dy\int_{0}^{e}v(z)dz=\frac{kle^3}{6}$$

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

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

La contrainte de cisaillement exercée par les forces visqueuses sur la paroi est alors obtenue par

$$\sigma = \eta \frac{\partial v}{\partial z}\Big)_{z=0}$$

soit

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

Expérimentalement, pour D = 10 mL/min, $e = 180\,\mu\text{m}$, et $l = 13\,\text{mm}$, on a σ = 2,4 Pa

2.4.3 Préparation des cellules et déroulement de l'expérience

On remplit d'abord l'ensemble du dispositif en tampon SB, en prenant 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 1 mL de tampon SB contenant 10^6 cellules. On laisse les cellules sédimenter une minute, à contrainte nulle, puis on élimine les cellules non adhérentes avec un flux de faible débit (< 1 mL/min, $\sigma \approx 0{,}1$ Pa), pendant 3 minutes. Enfin, on applique une contrainte déterminée, habituellement 2,4 pascals, en imposant un débit de fluide donné. Le débit est contrôlé par la différence de hauteur entre les réservoirs amont et aval. Après avoir réglé la mise au point, on lance l'acquisition d'images pendant 10 à 15 minutes.

2.4.4 Changement de milieu, utilisation du calcium et détermination de la concentration

Dans certaines expériences, au lieu d'utiliser un seul récipient en amont, on peut en utiliser deux, le premier contenant seulement le tampon SB, l'autre le tampon dans lequel on a rajouté une espèce chimique susceptible d'agir sur la cellule, par exemple du calcium. On passe de l'écoulement d'un fluide à l'autre grâce à un système de valves. Lorsque l'on fait des expériences à différentes concentrations de calcium, on laisse dans un premier temps les cellules adhérer en tampon SB, et on garde également le même fluide lors de la première minute du flux à faible débit. Pendant les deux dernières minutes du flux faible, on change de réservoir pour celui contenant du calcium. Puis on augmente le débit, et donc la contrainte de cisaillement, assez rapidement (en moins de 10 secondes). La raison de cette procédure est

que le calcium augmente grandement l'adhérence des cellules entre elles, on s'assure donc que les cellules sont bien adhérentes au verre et ne peuvent pas entrer en contact avant de les mettre en présence de calcium. On peut également rajouter de l'EGTA dans le tampon pour étudier le comportement des cellules à faible concentration de calcium libre.

2.4.5 Acquisition et traitement des images

Les mesures statistiques de motilité sous flux consistent en l'observation du comportement globale d'une trentaine de cellules adhérentes sur une lame de verre, soumises à une contrainte hydrodynamique par un écoulement uniforme.

Des photos sont prises à intervalle de temps constant (toutes les trente secondes pour une observation avec l'objectif 2,5x ; figure 2.14), puis assemblées pour former un film. Le mouvement d'ensemble des cellules apparaît alors nettement.

Nous analysons ensuite quantitativement ce film afin d'obtenir la vitesse et l'orientation instantanées moyennes de chaque cellule. Les cellules apparaissent comme des points blancs sur un fond noir. La position des cellules est déterminée à chaque instant, en utilisant la fonction *count* dans *Image Pro Plus*. Le comptage est basé sur la segmentation des images : les pixels de valeur inférieure à un seuil sont considérés comme le fond, et les pixels de valeur supérieure comme appartenant aux cellules. Afin que le seuil soit le même sur toute l'image, il est nécessaire de le rendre uniforme en appliquant la fonction *flatten background* d'Image Pro Plus qui supprime les variations d'intensité du fond. Le logiciel fait ainsi la différence entre les zones brillantes (les cellules) et les zones noires (le fond). Pour plus de précision, nous avons choisi de mesurer la position du centre de masse de chaque cellule à chaque image.

Dans Image Pro Plus, plusieurs procédures ont été mises au point pour suivre les cellules individuellement :

- Une procédure manuelle: quand on clique sur une cellule que l'on veut étudier, une aire de travail circulaire d'un rayon de 7 pixels (valeur réglable) se dessine autour du pixel sélectionné, et le logiciel détermine la position du centre de masse de l'unique objet contenu à l'intérieur de cette aire. Il faut répéter cette procédure tout le long du film, c'est-à-dire suivre avec la souris la même cellule sur toutes les images. La différence de position d'une cellule entre deux images successives, en abscisse et en ordonnée, est stockée dans le *data collector* d'*Image Pro Plus* puis dans un fichier

Excel, que nous exploiterons par la suite. On répète cette opération pour une trentaine de cellules.

- Une procédure de suivi automatique : cette macro est très semblable à la précédente, à la différence près que d'une image à la suivante la position du centre de l'aire de travail a t_{i+1} est reportée sur la position du centre de masse à t_i. Ainsi l'aire de travail se déplace automatiquement d'une image à l'autre en suivant une cellule sélectionnée. Cette procédure à l'avantage d'être bien plus rapide que la précédente, mais fonctionne mal quand les cellules sont très rapides. En effet, le programme les perd si l'aire de travail est trop petite, et si l'aire est trop grande, plusieurs cellules peuvent s'y trouver simultanément.

De plus, nous avons défini plusieurs critères pour le choix des cellules. 1) Elles doivent être réparties uniformément sur la surface. Pour cela on dessine une grille contenant trente cases, et on étudie une cellule par case. 2) On choisit des cellules qui ne rentrent pas en collision avec d'autres, car on s'intéresse uniquement au mouvement de la cellule induit par la force hydrodynamique. 3) Enfin, il faut que les cellules restent adhérentes pendant au moins 5 minutes (10 images), car si la cellule se décolle trop vite, l'information renvoyée n'est plus seulement la vitesse de la cellule, mais aussi la cinétique de décollement. (Decave et al., 2002)

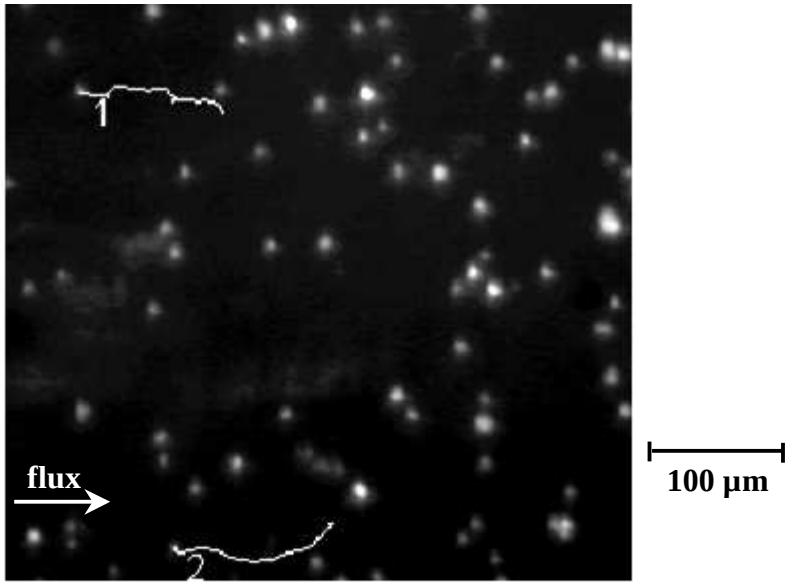


Fig 2.14 : Exemple de trajectoires de cellules soumises à un flux, grossissement 2,5x, 10 minutes d'enregistrement

2.4.6 Traitement des données, champ de vitesse et orientation des cellules

Le fichier Excel obtenu contient, à chaque instant t_i, le déplacement Δx et Δy de chaque cellule étudiée entre deux images. On calcule la norme du vecteur vitesse par la formule suivante

$$V_i = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\Delta t}$$

où Δt est le temps entre deux images. A un instant donné, on peut faire la moyenne $\langle v_i \rangle$ sur toutes les cellules analysées. Pour calibrer les distances sur le microscope, on a utilisé une cellule de Malassez.

On définit l'orientation d'une cellule entre deux images par le cosinus de l'angle entre le vecteur vitesse et l'axe Ox, qui est la direction du flux

$$\cos\left(\arctan\left(\frac{\Delta y}{\Delta x}\right)\right)$$

Si l'angle est supérieur à $\pi/2$, les cellules vont dans le sens inverse de l'écoulement et le cosinus est négatif. Si l'angle est inférieur à $\pi/2$, les cellules vont dans le sens de l'écoulement, et le cosinus est positif.

A un instant donné, on peut déterminer l'orientation moyenne du vecteur vitesse $\langle \cos\theta_i \rangle$ de toutes les cellules analysées.

2.5 Expériences de motilité sous flux à fort grossissement : analyse de la morphologie cellulaire et de la dynamique des zones de contact

En complément des mesures statistiques de motilité, il peut être intéressant d'avoir des informations sur le comportement des bords de la cellule soumise à une contrainte hydrodynamique. Cela peut être un bon moyen pour comprendre l'origine du mouvement cellulaire, en observant en particulier des cellules statistiquement peu motiles pour comprendre leur défaut.

2.5.1 Montage expérimental et déroulement de l'expérience

Pour observer le bord cellulaire, nous utilisons comme pour l'étalement cellulaire un microscope *Olympus IX 71*, muni d'un objectif à immersion de grossissement 60x. Cet objectif nous impose de travailler avec une lamelle couvre-objet et non plus une lame de microscope, car sa focale est de 0,17 millimètres. Nous avons donc créé une nouvelle chambre, adaptée aux dimensions des lamelles couvre-objet. L'écoulement hydrodynamique reste le même, seules les dimensions changent. Cependant, les lamelles sont plus fines que les lames, donc plus déformables et fragiles; il faut donc veiller à ne pas appliquer des gradients de pression trop forts, et arriver plus progressivement au débit de liquide désiré.

Le protocole expérimental est identique à celui des expériences de motilité sous flux à faible grossissement. Seule différence, l'acquisition démarre une fois l'écoulement à débit élevé stabilisé, car en changeant le débit on change la pression exercée sur la lamelle, ce qui la courbe et change la mise au point qui est très sensible. Si on a besoin de changer de milieu, on s'assurera que le liquide a exactement le même niveau dans les deux réservoirs en amont pour éviter une variation de la distance de mise au point. Les images sont prises à une seconde d'intervalle.

2.5.2 Acquisition et traitement des images

L'acquisition et le traitement des images sont semblables à ceux décrits au paragraphe 2.3 dans le cas de l'étalement cellulaire : on enregistre une image par seconde, en RICM, contraste de phase ou fluorescence. Les films RICM sont traités de la même manière pour obtenir pour chaque cellule les zones d'aire gagnée et perdue à chaque instant.

2.6 Adhérence cellulaire

Nous allons décrire dans ce chapitre le dispositif expérimental de la chambre à flux radial (Decave et al., 2002). Les cellules en adhérence sur une plaque de verre sont soumises à un

flux à géométrie radiale, permettant de mesurer le nombre de cellules qui se détachent en fonction de la contrainte appliquée, qui dépend du débit volumique de l'écoulement. On peut ainsi déterminer la force d'adhésion entre ces cellules et la surface de verre.

2.6.1 Chambre à flux radial, préparation des cellules et déroulement de l'expérience

Le dispositif expérimental est décrit sur la figure 2.15. Le substrat, une plaque de verre de 105mm x 85mm, est préparé suivant la méthode décrite dans le paragraphe 2.2, puis déposé sur le support se trouvant dans la cuve. Les cellules sont resuspendues dans du tampon SB et étalées régulièrement sur le substrat, à une densité d'environ 300 cellules par millimètre carré. Après un temps de sédimentation de 10 minutes, la plaque est recouverte de tampon phosphate jusqu'au niveau des évacuations de la cuve. Ces évacuations sont reliées à une trompe à eau, qui maintient constant le niveau de tampon dans la cuve tout au long de l'expérience.

Un disque en acier inoxydable de 80 mm de diamètre est ensuite posé délicatement sur le substrat. Le disque est percé en son centre d'un trou de 1,5 millimètres de diamètre, et repose sur trois vis micrométriques, qui permettent de régler la distance *e* entre le substrat et le disque (typiquement 250 à 500 μm). L'orifice central du disque est relié par un tuyau à un réservoir supérieur contenant du tampon phosphate. L'écoulement est généré par gravité entre le réservoir supérieur et la cuve. Une pompe péristaltique alimentée par un autre réservoir maintient le niveau de fluide constant dans le réservoir supérieur. De la sorte, le débit est constant, ce qui est important pour ne pas fausser les mesures d'adhésion. Le débit volumique est déterminé par le volume de fluide pompé pendant la durée de l'expérience.

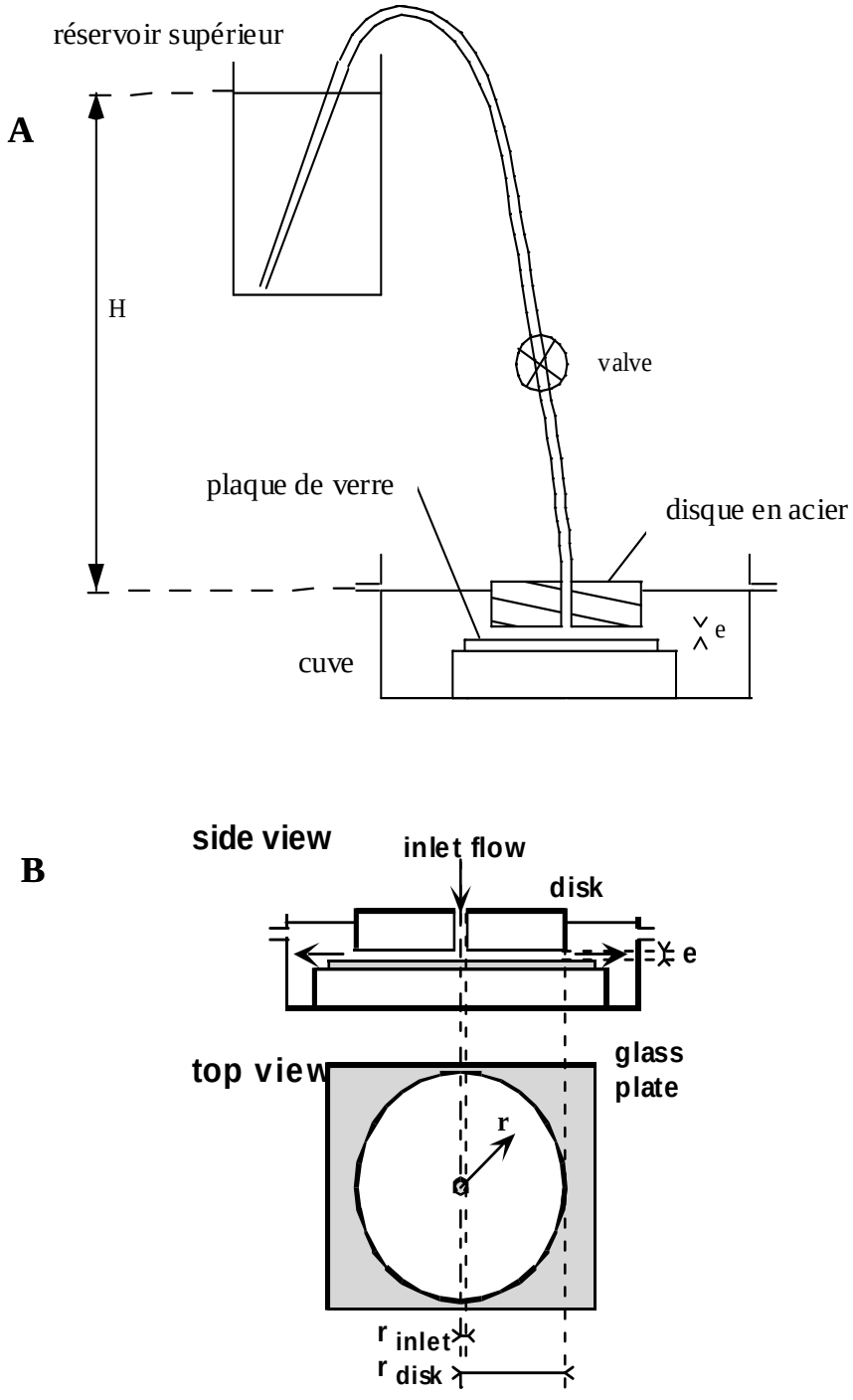


Fig 2.15 : ***A.*** *Vue générale du dispositif expérimental de la chambre à flux radial.* ***B****. vue détaillée de la chambre d'écoulement.*

2.6.2 Calcul de la contrainte appliquée aux cellules

Les cellules adhérentes subissent l'action des forces exercées par le fluide dans l'écoulement. On caractérise cette action mécanique par la contrainte à la paroi σ exercée par le fluide. La symétrie radiale de l'écoulement va nous permettre de calculer σ. Soit r la distance entre le point considéré sur le substrat et la projection du centre du disque sur le substrat, l'équation de Navier-Stokes s'écrit :

$$\rho\frac{\partial\vec{v}}{\partial t}+\rho\vec{v}.\vec{\nabla}\vec{v}=-\vec{\nabla}p+\eta\Delta\vec{v}$$

la géométrie de l'écoulement étant radiale, le vecteur vitesse est dirigé suivant le vecteur radial $\vec{e}_r$ et ne dépend pas de la coordonnée orthoradiale θ. On a donc $\vec{v}(\vec{r})=v(r,z)\vec{e}_r$ où z désigne la coordonnée verticale. Par conséquent, on a $\vec{v}.\vec{\nabla}\vec{v}=\vec{0}$. De plus, en régime stationnaire, le débit est constant et $\frac{\partial\vec{v}}{\partial t}=\vec{0}$. On suppose par ailleurs que $\vec{\nabla}p=\frac{\partial p}{\partial r}\vec{e}_r$. Il reste

$$\eta\frac{\partial^2 v}{\partial z^2}(r,z)=\frac{dp}{dr}$$

Les conditions aux limites à la surface du disque et de la plaque s'écrivent $v(r,0)=v(r,e)=0$. Une solution de cette équation, compatible avec les conditions aux limites, est de la forme

$$v(r,z)=k(r)z(e-z)$$

La quantité mesurable expérimentalement est le débit volumique de l'écoulement généré entre la plaque et le disque. Il faut donc relier le champ de vitesse au débit volumique *D*.
On a

$$D=\int_{\substack{surface\\latérale}}\vec{v}.d\vec{S}$$

En géométrie radiale, $d\vec{S}=2\pi r dz.\vec{e}_r$. On a donc

$$D=2\pi r\int_0^e v(r,z)dz=2\pi rk(r)\int_0^e z(e-z)dz$$

soit

$$D=\frac{\pi e^3 rk(r)}{3}$$

On obtient finalement l'expression du champ de vitesse

$$v(r) = \frac{3D}{\pi r e^3} z(e - z)$$

La contrainte à la surface de la plaque de verre est obtenue par

$$\sigma(r) = \eta \frac{\partial v}{\partial z}\Big)_{z=0}$$

ce qui donne

$$\boxed{\sigma(r) = \frac{3D\eta}{\pi r e^2}}$$

Expérimentalement, pour D = 45 mL/min, et e = 250 micromètres. σ varie donc entre 0,29 Pa, à la limite extérieure du disque, et 12,9 Pa à r = 0,75 mm, qui correspond au rayon du trou dans le disque. La formule n'est plus valable pour des rayons plus petits.

2.6.3 Acquisition et traitement des images

Au bout d'un temps donné, on mesure la distribution des cellules toujours présentes sur le substrat en fonction de la distance au centre de l'écoulement, et donc de la contrainte appliquée.

Cette distribution est obtenue par observation microscopique en fond noir au grossissement 2,5 x (même microscope et caméra que pour la motilité sous flux à faible grossissement). Une série de clichés (voir figure 2.16) est prise le long d'un axe Ox passant par l'endroit où se trouvait le centre du disque (origine de l'écoulement). Ce point peut être repéré grâce à la présence d'un point de stagnation (en face du trou central du disque, le flux exerce une contrainte normale à la surface sur les cellules, et celles-ci se décollent moins qu'ailleurs, comme on peut le voir sur la figure 2.16). Après association des images les unes à la suite des autres, on reconstitue une bande d'observation allant de l'origine 0 de l'écoulement à une distance $r = 20$ mm de celle-ci, de part et d'autre de l'origine. Des images sont également enregistrées à $r = 40$ mm et $r = 50$ mm (en dehors du disque) afin de mesurer le nombre initial de cellules (contrainte nulle).

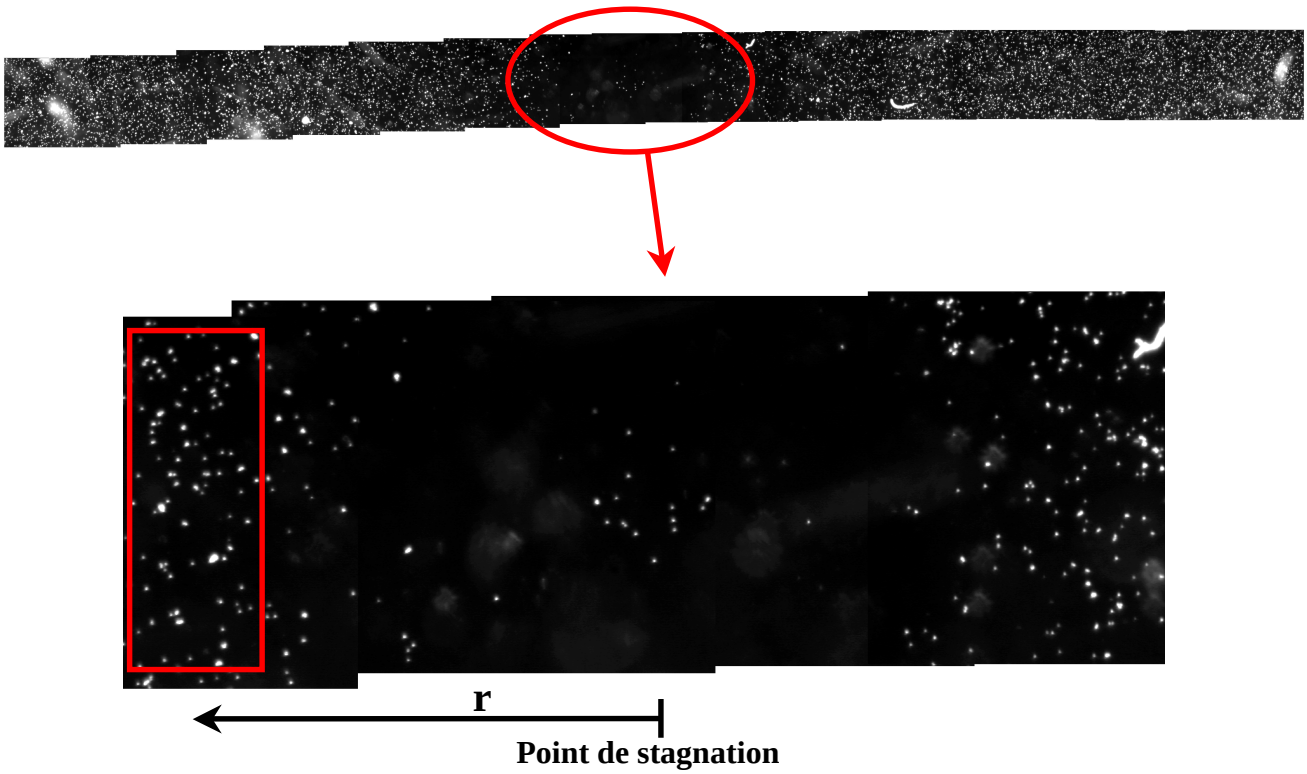


Fig 2.16 : *Image reconstituée du substrat après une expérience de décollement, avec un exemple de point de stagnation, permettant de trouver le centre de l'écoulement. Le rectangle rouge représente la fenêtre de comptage que l'on déplace de proche en proche.*

Ensuite, la densité des cellules restantes après l'écoulement est déterminée par comptage à l'aide du logiciel *Image Pro Plus*. On définit une fenêtre d'intérêt de dimension $0{,}3 \times 2$ mm² que l'on fait glisser le long de l'axe Ox (rectangle rouge sur la figure 2.16). A chaque position, on égalise localement la luminosité du fond avec la fonction *flatten background*. Cela augmente d'une part le contraste entre le fond et les cellules et d'autre part efface les pollutions lumineuses dues à des poussières ou à des réflexions parasites. On réalise ensuite un seuillage avec la fonction *count*, en éliminant les objets dont l'aire est inférieure à 10 pixels². Il faut enfin corriger le comptage à cause de la présence d' agrégats de plusieurs cellules, qui sont comptés comme un seul objet. Pour cela, on détermine l'aire des objets uniques et on divise l'aire des agrégats par celle des objets uniques.

On fait de même pour les images prises en dehors du disque, ce qui donne la densité initiale de cellules, qui servira à normaliser les résultats. On calcule finalement le pourcentage de cellules restantes en fonction de r, distance à l'origine de l'écoulement.

2.6.4 Détermination de la contrainte seuil apparente de détachement

La figure 2.17 nous montre un exemple de courbe de détachement cellulaire : pourcentage de cellules décollées en fonction de la distance au centre de l'écoulement *r*.

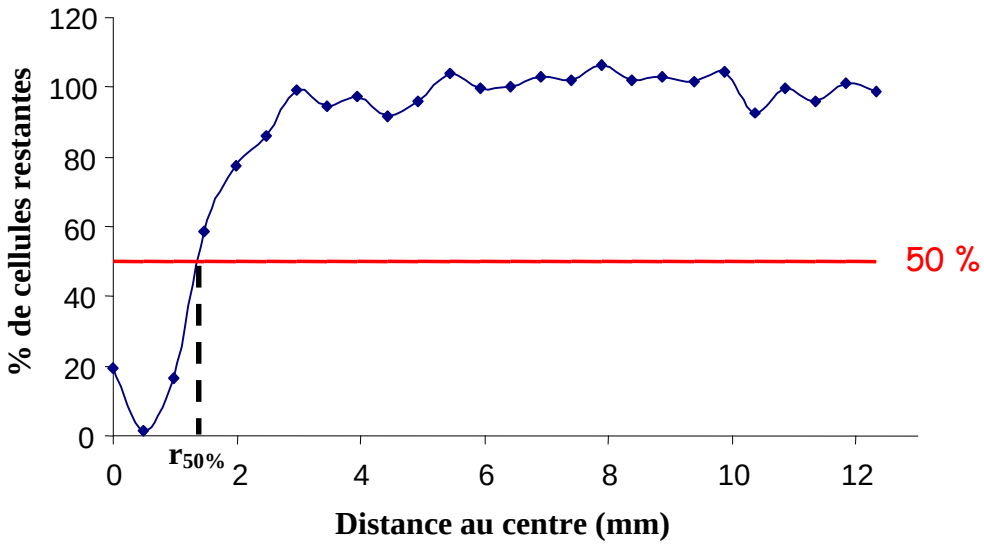


Fig 2.17 : *Courbe (en bleu) donnant le pourcentage de cellules décollées en fonction de la distance au centre de l'écoulement r. La distance* $r_{50\%}$ *pour laquelle la moitié des cellules sont décollées est indiquée.*

On définit la contrainte seuil de décollement comme la contrainte qui décolle la moitié des cellules sur le substrat. Par interpolation, on détermine à quelle distance $r_{50\%}$ du centre la densité des cellules qui restent est la moitié de la densité initiale. On obtient finalement la contrainte seuil de décollement par la formule :

$$\sigma_{50\%} = \frac{3D\eta}{\pi r_{50\%} e^2}.$$

3 RESULTATS

3.1 Etalement cellulaire

Lorsqu'une cellule entre en contact avec une surface, il faut tout d'abord qu'elle s'étale sur cette surface et qu'elle y adhère avant de pouvoir se déplacer. De plus, le déplacement fait appel notamment à l'émission de pseudopodes et à leur adhésion sur le substrat. Le montage expérimental mis au point au laboratoire permet d'étudier presque exclusivement ce phénomène, en s'intéressant à l'évolution de l'aire de contact entre la cellule et la surface au cours de l'étalement cellulaire (figure 3.1).

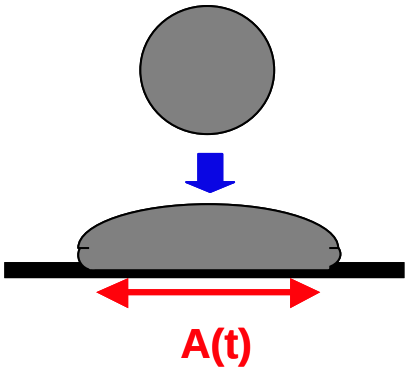


Fig 3.1 : principe de l'étalement cellulaire : les cellules tombent sur le substrat par gravitation. On observe l'évolution de l'aire de contact A(t) en fonction du temps.

Nous allons dans un premier temps décrire l'étalement cellulaire de *Dictyostelium discoideum* de manière générale, et montrer que malgré la variabilité de cellule à cellule des comportements généraux se dégagent. Puis nous mettrons en évidence le caractère périodique du comportement de la cellule, pour enfin étudier l'influence de la nature du substrat et de la concentration de calcium extracellulaire sur ces mouvements périodiques.

3.1.1 Cinétique d'étalement de Dictyostelium discoideum.

Description qualitative de l'étalement

Dans cette première partie, nous allons décrire l'étalement de cellules sauvages AX2, resuspendues en tampon phosphate (SB), sur une surface de verre. On suit l'évolution de l'aire de contact avec la surface par RICM. Des images extraites d'un film représentatif sont données dans la figure 3.2.

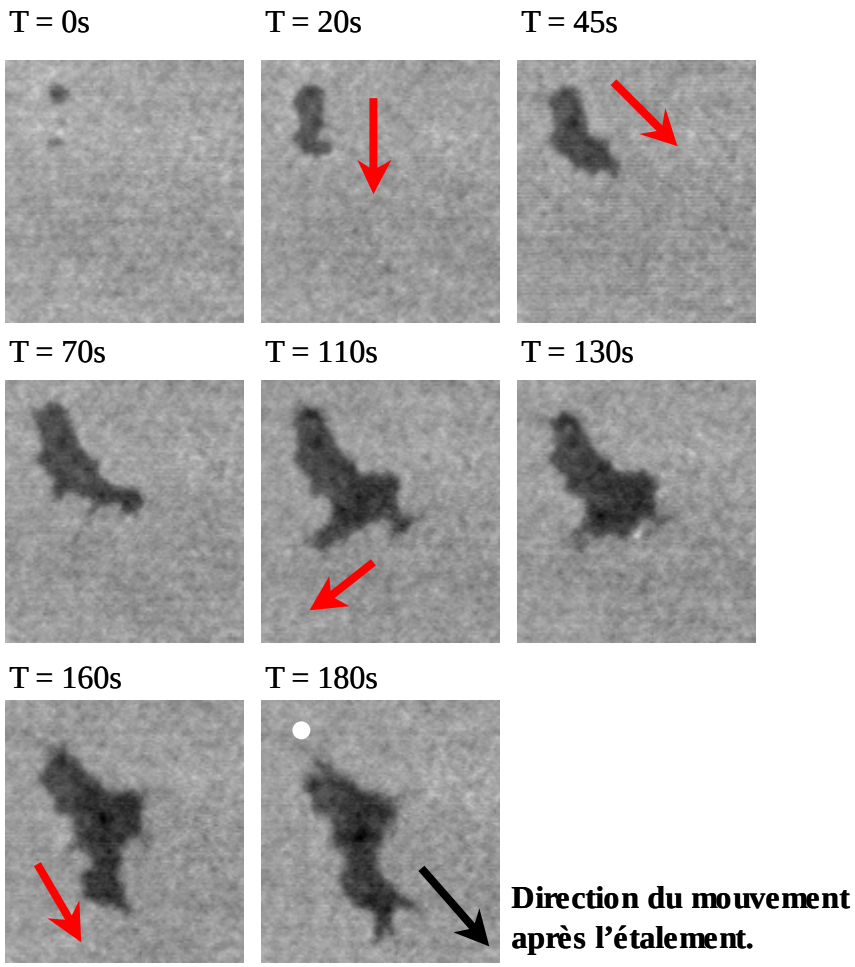


Fig 3.2 Etalement d'une cellule Ax2 en fonction du temps, sur une surface de verre et en tampon SB. Temps en secondes. Les flèches rouges indiquent les directions successives prises par l'étalement. Le point blanc sur la dernière image indique le point de contact initial.

Au moment où la cellule entre en contact avec la surface, une première zone sombre apparaît. C'est l'instant que l'on définit comme origine des temps. Une petite période de latence peut parfois suivre, puis l'aire de contact commence à augmenter. On peut alors distinguer deux phases : pendant une à deux minutes, l'aire augmente, puis elle se stabilise. Au niveau morphologique, pendant les toutes premières secondes, l'étalement se fait dans toutes les

directions, mais rapidement des directions d'étalement principales apparaissent, on peut en distinguer trois successives sur le film de la figure 3.2 (voir t= 20s, 45s et 110s).

A t = 110s, la cellule atteint son aire maximale. Ensuite, tandis que l'aire continue de s'étendre à l'avant de la cellule (vers le bas sur les images de la figure 3.1, à t= 160 et 180s), l'aire disparaît à l'autre extrémité de la cellule: La cellule a fini de s'étaler, et commence à se déplacer. Cette phase de mouvement n'est pas toujours présente, à la fin de l'étalement, la cellule peut rester immobile. Mais lorsque la cellule bouge, elle le fait, la plupart du temps, dans la dernière direction prise par l'étalement. Au-delà de ces observations très générales, il existe une grande variété de formes et de cinétiques d'étalement pour les cellules *Dictyostelium discoideum*.

Cinétique d'étalement A(t)

La première grandeur à laquelle on a facilement accès est l'aire de la zone de contact A(t) au cours de l'étalement cellulaire. L'évolution de cette aire en fonction du temps pour trois cellules Ax2 est représentée sur la figure 3.3. L'aire de contact commence par augmenter de manière pratiquement linéaire. Puis on atteint un plateau et la surface cellulaire reste à peu près constante. On peut faire le parallèle entre ces deux phases et les phases d'étalement puis de motilité décrites précédemment.

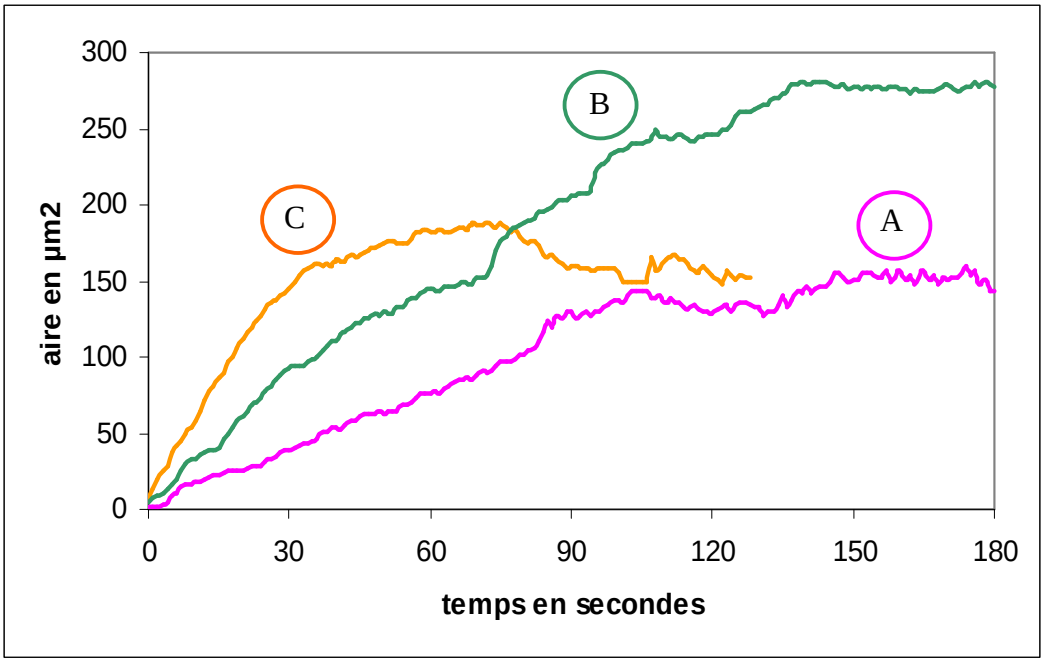


Fig 3.3 : Etalement de trois cellules AX2 en fonction du temps, sur verre et en tampon SB. La courbe A correspond au film de la figure 3.2.

Les cinétiques d'étalement sont très variables d'une cellule à l'autre. D'une part, les aires totales atteintes et les vitesses initiales d'étalement diffèrent fortement (voir figure 3.3), on observe donc des écarts-types très importants sur les courbes moyennes d'étalement (voir figure 3.4). D'autre part, concernant l'allure des courbes, on peut distinguer plusieurs cas :

- La phase de croissance est continue, et l'aire de contact varie très peu après. C'est le cas de la cellule A sur la figure 3.3. Ces étalements sont dits réguliers.
- La phase de croissance est discontinue. Des phases de forte croissance alternent avec des phases de croissance plus faible, voire nulle. Ces étalements sont dits irréguliers. C'est le cas de la cellule B.
- Parfois, la cellule commence par se rétracter un peu avant de devenir motile. Dans ce cas l'aire ne se stabilise pas autour de l'aire maximale atteinte, mais un peu en dessous, c'est le cas de la cellule C.

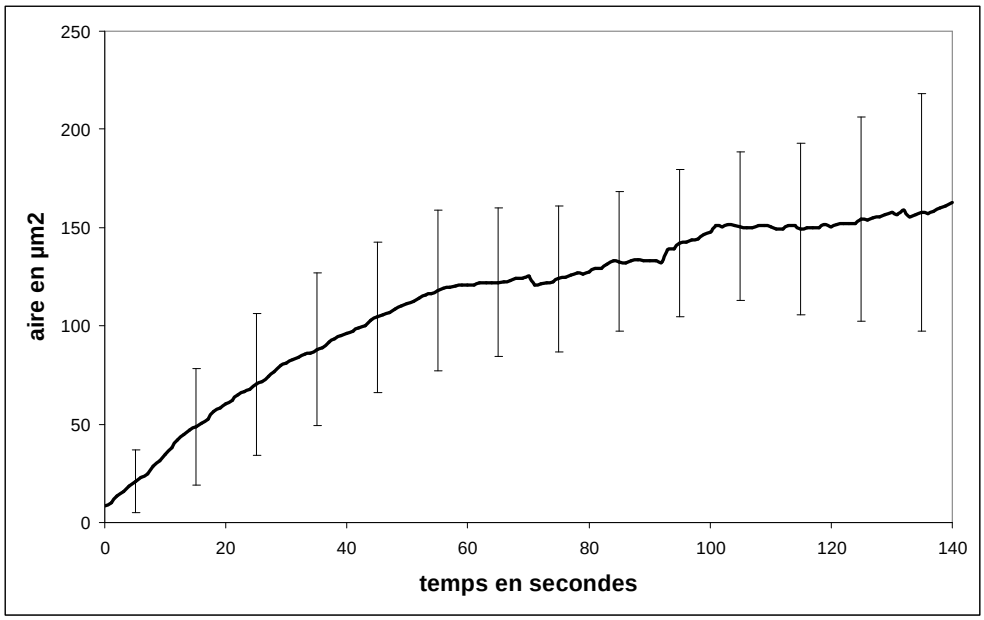


Fig 3.4 : Etalement moyen de cellules AX2 sur verre en SB. La moyenne est réalisée sur 15 cellules. Les barres correspondent aux écarts-types.

Mais au-delà des particularités de chaque cellule, en moyennant la cinétique d'étalement sur plusieurs cellules, on obtient une courbe assez régulière (figure 3.4). On déduit de cette figure que la durée typique de l'étalement de cellules AX2 sur verre en milieu SB est d'environ 100 secondes, et que l'aire maximale atteint environ 150µm^2. Compte tenu de la taille des cellules en suspension (10µm de diamètre environ, soit une surface de membrane d'environ 310µm^2

pour une cellule sphérique), cela signifie que les cellules sont très aplaties sur la surface ou bien qu'elles disposent de réserves de membrane importantes.

L'étalement est un processus actif impliquant la polymérisation de l'actine

L'étalement est-il un simple phénomène passif de déformation de la cellule par les forces de gravité ou bien fait-il intervenir d'autres forces comme la polymérisation d'actine ? Nous avons ajouté différentes concentrations de latrunculine A aux cellules AX2 reprises en tampon SB, une minute avant de les laisser s'étaler sur la surface de verre. La latrunculine A empêche la polymérisation de l'actine en se liant aux monomères d'actine avec une très forte affinité. En revanche, la dépolymérisation des filaments existants n'est pas affectée, ce qui conduit à la disparition du cytosquelette d'actine. Dès 1µM de latrunculine, la cinétique de l'étalement est ralentie. Et à partir de 2µM, l'aire maximale atteinte et la vitesse à laquelle on atteint cette aire sont grandement diminuées (figure 3.5). L'étalement est donc bien un processus actif impliquant la polymérisation de nouveaux filaments d'actine.

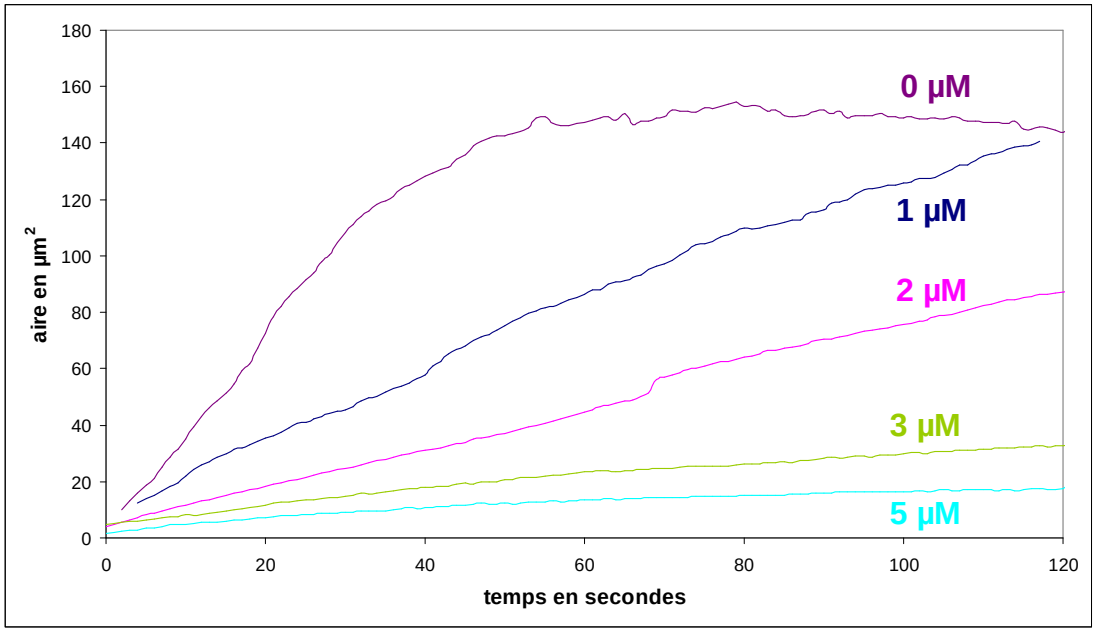


Fig 3.5 : Etalement de cellules AX2 en tampon SB + 500µM $CaCl_2$ en présence de différentes concentrations de latrunculine (les concentrations sont indiquées sur les courbes). Chaque courbe est tracée à partir des données obtenues sur 5 cellules.

La concentration en actine-G dans la cellule étant de l'ordre de 50µM, ces concentrations de latrunculine peuvent paraître faibles pour inhiber la polymérisation d'actine simplement en séquestrant les monomères. Des travaux sur la latrunculine A ont montré que les cellules

concentrent cette molécule dans le milieu intracellulaire, ce qui pourrait expliquer l'effet de la latrunculine à de faibles concentrations (Pring et al., 2002).

Ces données peuvent être comparées à celles obtenues en utilisant de la cytochalasine A, qui empêche la polymérisation d'actine en se fixant à l'extrémité barbée des filaments d'actine (figure 3.6). Les expériences avec la cytochalasine A ont été réalisées au laboratoire par Sébastien Fache.

La vitesse d'étalement initiale $dA/dt\big|_0$ décroît de manière quasi-exponentielle avec l'augmentation de la concentration en latrunculine, alors qu'avec la cytochalasine on voit apparaître un seuil en dessous duquel il ne semble pas y avoir d'effet. La latrunculine semble donc agir à plus faible dose que la cytochalasine. L'origine de cette différence d'activité n'est pas connue. Le phénomène de concentration de la latrunculine décrit ci-dessus pourrait être impliqué. D'autre part, des travaux sur l'étalement de neutrophiles (Sengupta et al., 2006) ont montré cette même différence d'effet : A une concentration de 2µM, l'étalement est complètement inhibé par la latrunculine. En revanche, à la même concentration de cytochalasine, les cellules s'étalent, mais de manière isotrope. Cette concentration suffit donc à éliminer la polarisation cellulaire, mais pas à bloquer la polymérisation d'actine.

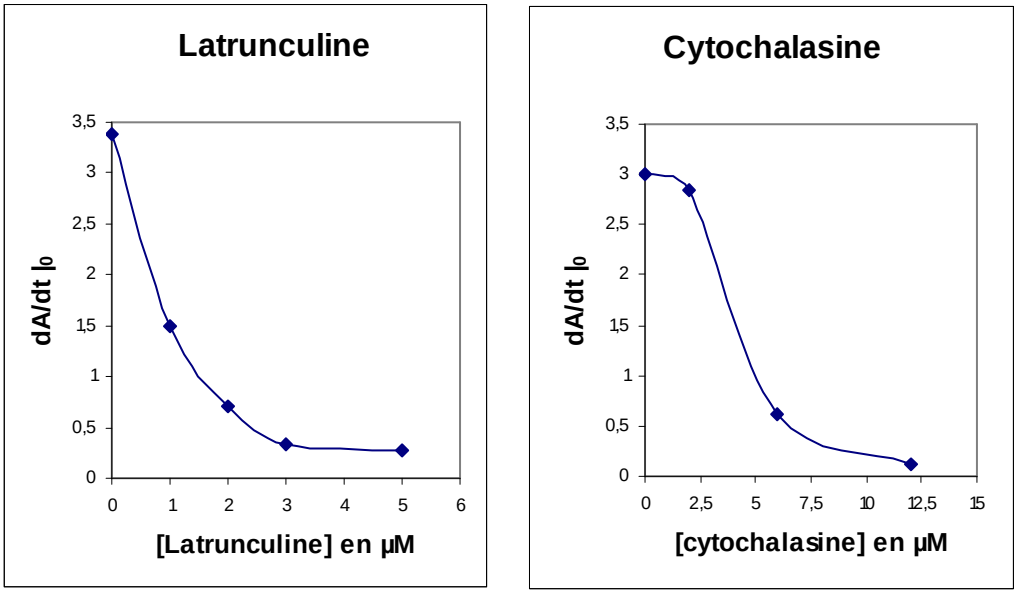


Fig 3.6 Comparaison entre l'effet de la latrunculine et de la cytochalasine sur la pente à l'origine des cinétiques d'étalement. Expériences faites sur des cellules AX2, en tampon SB + 500µM $CaCl_2$, sur une surface de verre

Paramètres macroscopiques de l'étalement cellulaire

A partir de ces données expérimentales, François Chamaraux et Bertrand Fourcade ont développé un modèle physique de l'étalement cellulaire *(Chamaraux et al., 2005).* Ce modèle fait intervenir deux processus : d'une part, la polymérisation de l'actine au niveau de la zone de contact, dont on suppose qu'elle est stimulée par le contact, tend à pousser la membrane et constitue le moteur de l'étalement. D'autre part, la tension membranaire sur le bord de la zone de contact, qui augmente au cours de l'étalement, tend à s'opposer à l'étalement.

Ce modèle met en évidence deux paramètres caractéristiques de chaque cellule : l'aire maximale A_{max} et un facteur d'échelle $1/\alpha$ qui est une constante de temps. L'évolution de l'aire de contact d'une cellule au cours de l'étalement est décrite, à l'aide de ces paramètres, par :

$$\boxed{A(t) = A_{\max} \tanh(\alpha t)}$$

Les courbes expérimentales de cellules individuelles peuvent être ajustées par cette équation. Par exemple, la figure 3.7 montre un tel ajustement pour les courbes d'étalement A, B et C de la figure 3.3.

L'aspect général des courbes est bien rendu, avec l'expansion initiale quasi-linéaire puis la saturation jusqu'à aboutir à un plateau. Comme signalé précédemment, cette modélisation nous donne accès à une constante de temps, $1/\alpha$, et à une aire totale atteinte A_{max}, caractéristiques de chaque cellule. Néanmoins, cet ajustement ne suffit pas pour décrire complètement l'étalement. Par exemple, à 70s, l'aire de contact de la cellule A s'écarte de $20\mu m^2$ de la courbe d'ajustement, et revient près de celle-ci à 110s. L'erreur de mesure de A(t) étant inférieure à $5\mu m^2$, comme on peut en juger sur la portion entre 130 et 180s, cet écart à la courbe d'ajustement, qui représente une irrégularité dans l'étalement de la cellule, est significatif.

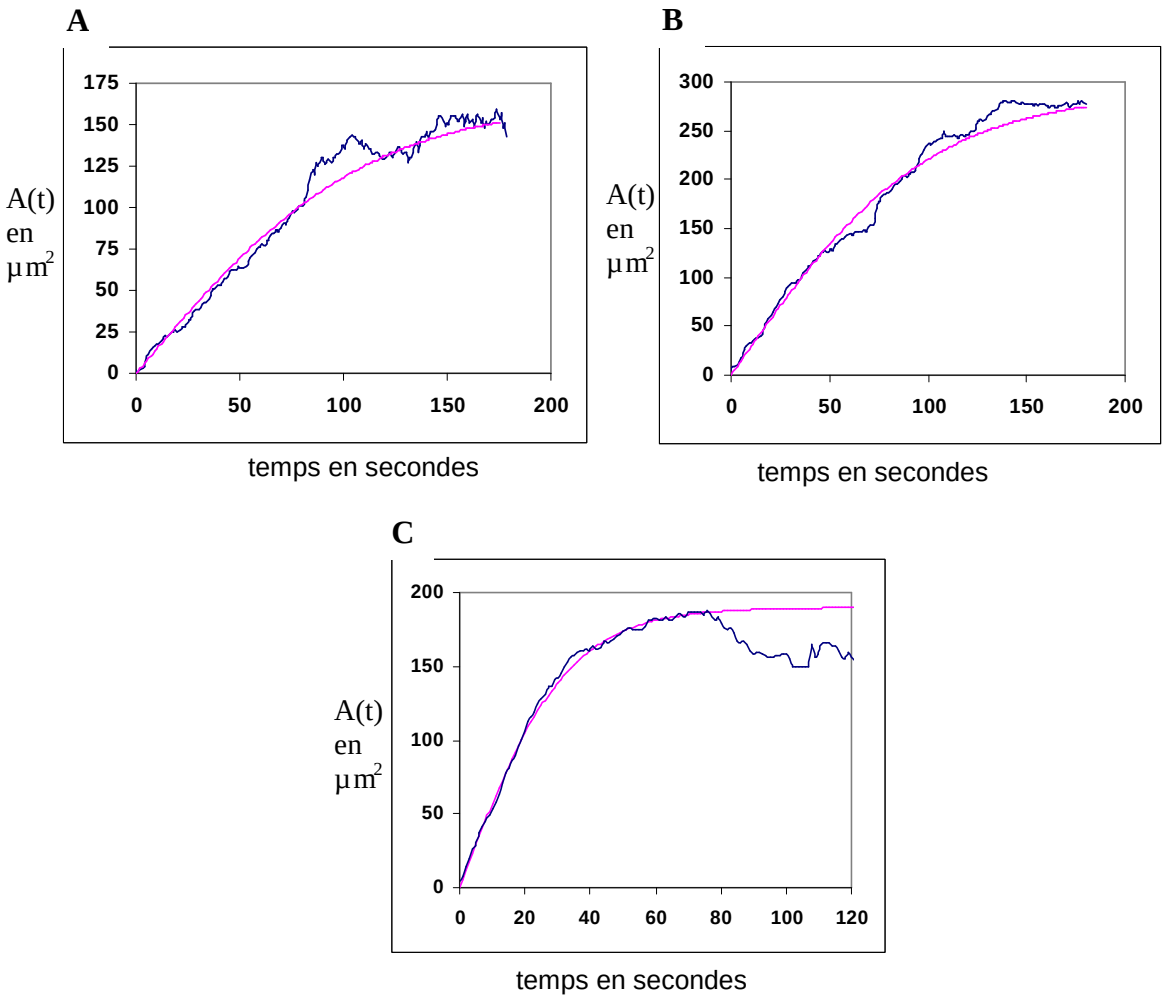


Figure 3.7 : Ajustement des courbes d'étalement A, B et C par une fonction A_{max} tanh(αt). Valeur des paramètres : A_{max} = 165µm², α = 0,009 s^{-1} pour la cellule A, A_{max} = 290µm², α = 0,010 s^{-1} pour la cellule B et A_{max} = 190µm², α = 0,031 s^{-1} pour la cellule C.

3.1.2 Etude des protrusions et rétractions. Mise en évidence d'une activité périodique

Mesure quantitative de l'activité de protrusion et de rétraction

Pour mieux comprendre ces irrégularités, notamment l'existence de plateaux lors de l'étalement, mais aussi pour comprendre le passage de la phase d'étalement à la phase de motilité, nous avons cherché à mieux définir et quantifier les protrusions et rétractions émises au cours du temps par la cellule. Pour cela, nous avons appliqué sur nos enregistrements le

traitement décrit au paragraphe 2.3.3 du Matériels et Méthodes. Ce programme définit pour chaque image les zones d'aire gagnée (protrusions, en bleu), les zones d'aire perdue (rétractions, en rouge) et les zones stables (vert) par rapport aux images précédentes, et il quantifie les aires de chaque zone.

Des images du film correspondant à la cellule A étudiée précédemment sont représentées sur la figure 3.8.

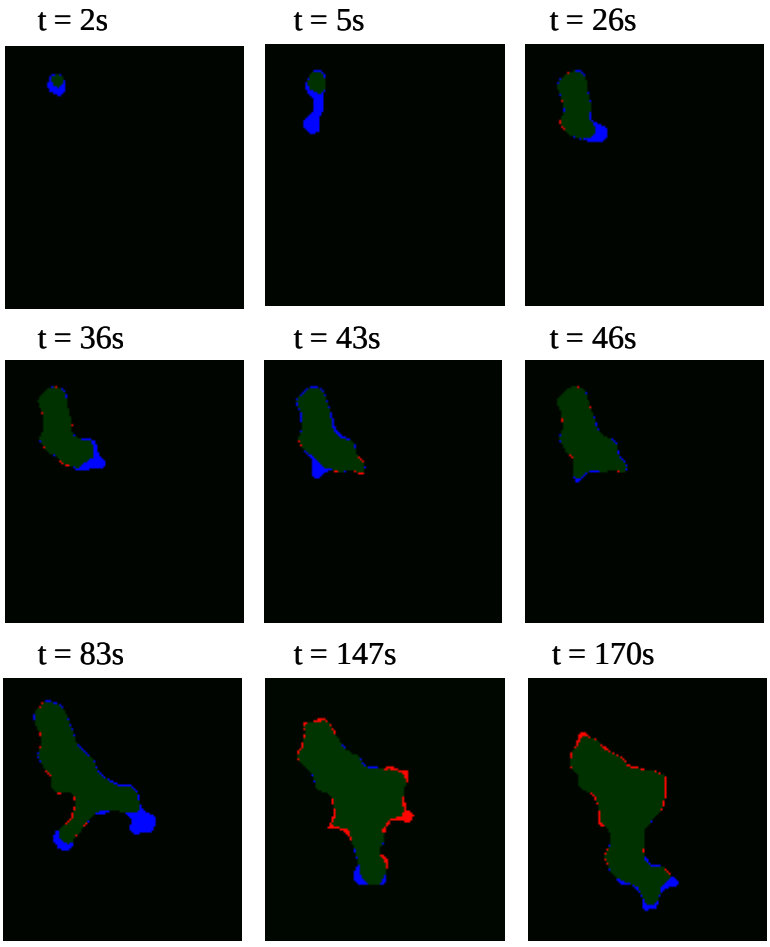


Fig 3.8 Images 3 couleurs de l'étalement de la cellule A (figure 3.3) sur verre en tampon SB. Les protrusions sont en bleu, les rétractions en rouge et l'aire invariante en vert.

On retrouve sur la première image (t=2s) une aire gagnée de manière quasiment isotrope, puis l'étalement devient directionnel, et on voit se succéder des protrusions localisées à différents endroits de la cellule (t=5s, 36s, 43s et 83s). Les protrusions sont en général bien séparées les unes des autres dans le temps. Mais il arrive que plusieurs protrusions aient lieu en même temps (t = 83s par exemple). L'aire n'est donc pas toujours gagnée au même endroit, et elle

n’est pas non plus gagnée en continu : à t = 46s par exemple, il n’y a pratiquement pas de protrusions ni de rétractions. Il peut donc y avoir un temps de latence entre deux protrusions. D’autre part, on peut remarquer qu’avant 80s environ, il n’y a pratiquement pas de rétractions. Cela correspond à la phase d’étalement. Les rétractions n’apparaissent qu’à la fin de l’étalement, au moment où l’aire se stabilise (t=147s). A la fin de l’étalement, la cellule est souvent polarisée, comme on le voit ici : à t = 170s, une extrémité de la cellule avance (bleu), l’autre se rétracte (rouge). Cette polarisation et l’exclusion mutuelle des protrusions et des rétractions est essentielle pour que la cellule puisse se déplacer, comme on l’a vu dans l’introduction.

Activité quasi périodique de protrusion et de rétraction

La quantification des zones bleues et rouges à chaque image nous donne les quantités d’aire gagnées et perdues par seconde par la cellule (figure 3.9). Ce graphe confirme que pendant les 100 premières secondes, la cellule fait surtout des protrusions et peu de rétractions. D’autre part, le niveau moyen de protrusions reste à peu près constant tout au long du film, (1,5 µm2/s entre 0 et 50s, 2,2µm2/s entre 50 et 100s et 1,8µm2/s entre 100 et 150s) alors que le niveau moyen de rétractions augmente petit à petit (respectivement 0,2µm2/s, 0,8µm2/s et 1,4µm2/s pour les même intervalles).

On remarque également que les gains et pertes d’aire ne se font pas à une vitesse constante, mais ont lieu par pics assez régulièrement espacés, d’amplitude très variable. Ainsi, pour la cellule observée, les principaux pics entre 0 et 100 secondes (pics marqués par un point) sont espacés de 8,2 ± 2,8s. On vérifie également que ces pics correspondent aux protrusions observées sur le film de la figure 3.8 (voir par exemple les pics à t = 26s, 36s et 43s, et l’absence de pic à t = 46s). On peut réaliser la même analyse pour les rétractions, même si le signal est plus faible que pour les protrusions, et par conséquent plus bruité. Si on ne conserve que les données à partir de t = 100s, on obtient pour la cellule considérée une période entre deux pics de 8,2 ± 3s pour les rétractions, c'est-à-dire une période équivalente à celle des protrusions.

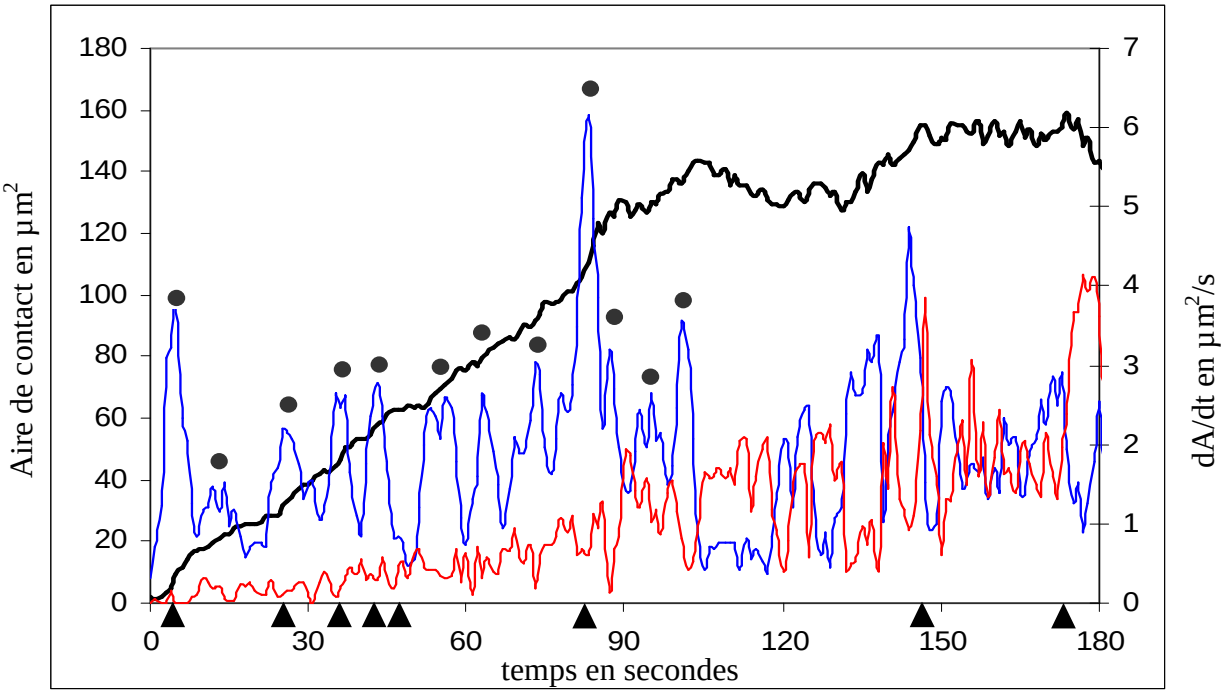


Figure 3.9 : Evolution au cours du temps de l'aire de contact (en noir, échelle de gauche), des protrusions (en bleu) et des rétractions (en rouge) (échelle de droite), d'une cellule Ax2 en tampon SB sur verre. Les triangles font références aux temps dont sont extraits les images de la figure 3.8 . Les points correspondent aux principaux pics de la courbe de protrusion pendant les 100 premières secondes.

En conclusion, les protrusions et rétractions ne semblent pas être des évènements aléatoires, mais semblent être émis périodiquement. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la statistique des périodes entre deux pics de protrusions pour l'étalement de dix cellules indépendantes en tampon SB (Figure 3.10). On peut distinguer principalement deux groupes d'évènements : environ 70% des pics sont séparés par 5 à 10 secondes, et environ 20% par 11 à 16s. Cette distribution d'intervalles de temps a été ajustée par la somme de deux lois normales, de moyennes 7,25 et 14,5s et d'écart type 2,4s (courbe rouge sur la figure 3.10).

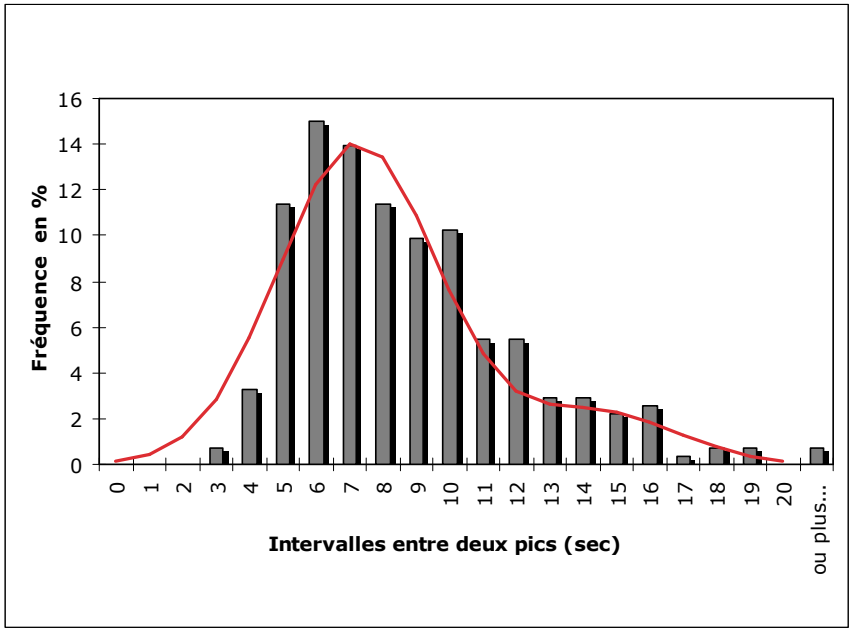


Fig 3.10 : Histogramme donnant la distribution de l'intervalle de temps entre deux pics pour l'étalement de cellules AX2 sur verre en tampon SB. La courbe rouge correspond à l'ajustement des données par la somme de deux lois normales de moyenne 7,25 et 14,5s.

Ces données suggèrent que les cellules émettent toutes des protrusions à la même fréquence, environ 0,14Hz (1 / 7,25s). Les intervalles de temps plus grands (supérieurs à 10s), pouvant correspondre à des cas où un ou deux pics intermédiaires n'ont pas été détectés, par exemple parce que le signal était trop faible. On obtient dans ce cas des valeurs d'intervalle doubles ou triples de la période de base, ce qui explique l'apparition d'évènements autour de 14-15s, et à une moindre mesure autour de 20s.

Si la période d'oscillation des protrusions ne varie pas trop de cellule à cellule, on doit retrouver cette périodicité sur la moyenne des courbes de protrusions pour plusieurs cellules. Nous avons fait de telles moyennes pour les protrusions et les rétractions, en normalisant les aires gagnées et perdues par l'aire maximale atteinte par chaque cellule lors de l'étalement pour pouvoir les comparer.
De plus, le temps d'apparition du premier pic pouvant varier d'une cellule à l'autre, nous avons décidé d'aligner le premier pic de protrusion de chaque cellule. La courbe obtenue pour 14 cellules AX2 en tampon SB sur une surface de verre est dessinée en figure 3.11.

On constate que les oscillations n'ont pas disparues. De plus, elles sont visibles pour les protrusions comme pour les rétractions, ce qui nous montre que la période d'oscillation des

rétractions ne varie pas trop non plus de cellule à cellule. D'après la figure 3.11, on peut l'estimer à 6,2 ± 2,0s, c'est-à-dire une période équivalente à celle des protrusions.

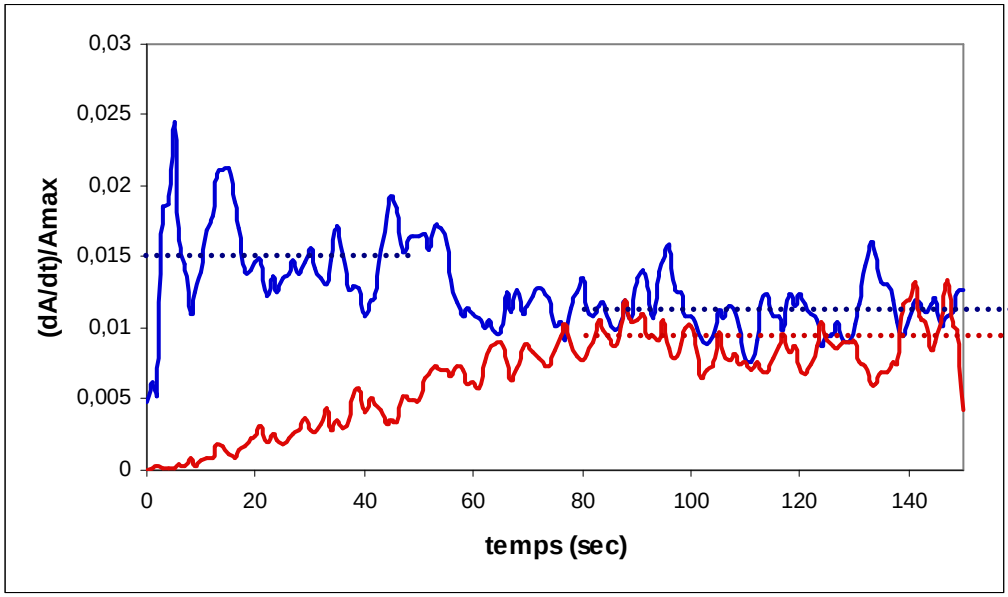


Fig 3.11: Courbes des protrusions et rétractions moyennes pour 14 cellules AX2 s'étalant en tampon SB sur une surface de verre. Périodes : protrusions : 7,1 ± 2,3s ; rétractions : 6,2 ± 2,0s . Les traits pointillés indiquent le niveau moyen de protrusion entre 0 et 50s, et les niveaux moyens de protrusion et rétractions entre 80 et 130s.

Transition étalement-motilité

On voit sur la figure 3.11 qu'au-delà de 100s environ, c'est-à-dire quand la phase d'étalement se termine, le niveau moyen des protrusions et celui des rétractions sont très proches, mais ne sont pas nuls. La fin de l'étalement ne semble donc pas être liée à un arrêt de l'activité de protrusion des cellules, mais plutôt à un état stationnaire où les activités de protrusion et de rétraction sont égales.

Pour illustrer cela, nous nous sommes intéressés à la somme des valeurs d'aire gagnée (protrusions) et d'aire perdue (rétractions) entre le début de l'étalement et l'instant t (figure 3.12). La différence entre ces deux quantités doit donner à chaque instant l'aire de contact de la cellule. Ces calculs sont réalisés à partir des valeurs moyennes représentées sur la figure 3.11.

Au cours des 50 premières secondes de l'étalement, l'activité de protrusion est d'environ 1,5 % de l'aire maximale par seconde, et les rétractions sont pratiquement absentes. Au-delà de

80s, l'activité de protrusion décroît, l'activité de rétraction augmente et toutes les deux se stabilisent à des valeurs comparables (1,1 et 0,9% de l'aire maximale par seconde pour les protrusions et les rétractions, voir traits pointillés sur la figure 3.11). Tout se passe comme si l'apparition des rétractions venait limiter la dynamique des protrusions.

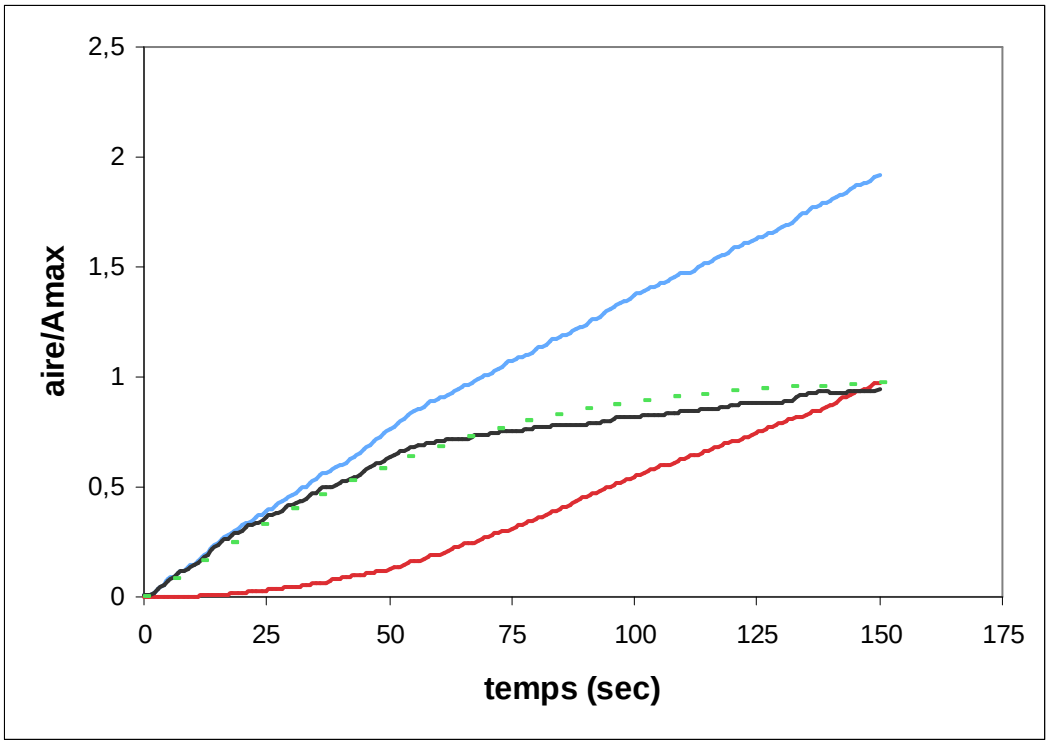


Fig 3.12 : Activités de protrusion et de rétraction intégrées entre l'instant initial et l'instant t. Activité de protrusion en bleu, activité de rétraction en rouge. La différence entre activité de protrusion et de rétraction, en noir, est ajustée par une fonction tanh(αt) (pointillés) (α=0,014 s^{-1}). Etalement de cellules AX2 en tampon SB sur du verre. Les aires sont normalisées à l'aire maximale atteinte.

Nous nous sommes ensuite demandés pourquoi les rétractions augmentaient au cours du temps, et quel pouvait être l'élément déclencheur de ces rétractions. Une explication possible est qu'au fur et à mesure que la cellule s'étale, elle se déforme et déforme sa membrane, ce qui aurait pour conséquence de créer une force liée à la tension membranaire. Cette dernière pourrait freiner l'étalement et faire apparaître des rétractions, ce qui serait en bon accord avec les observations précédentes et avec le modèle physique de l'étalement cellulaire de François Chamaraux et Bertrand Fourcade décrit précédemment. Pour tester cette hypothèse, nous avons représenté sur la figure 3.13 la valeur des protrusions et des rétractions à l'instant t en fonction de l'aire totale d'étalement à cet instant t, en prenant comme valeur l'étalement moyen des cellules AX2 en tampon SB et les valeurs moyennes de protrusions et rétraction de la figure 3.11.

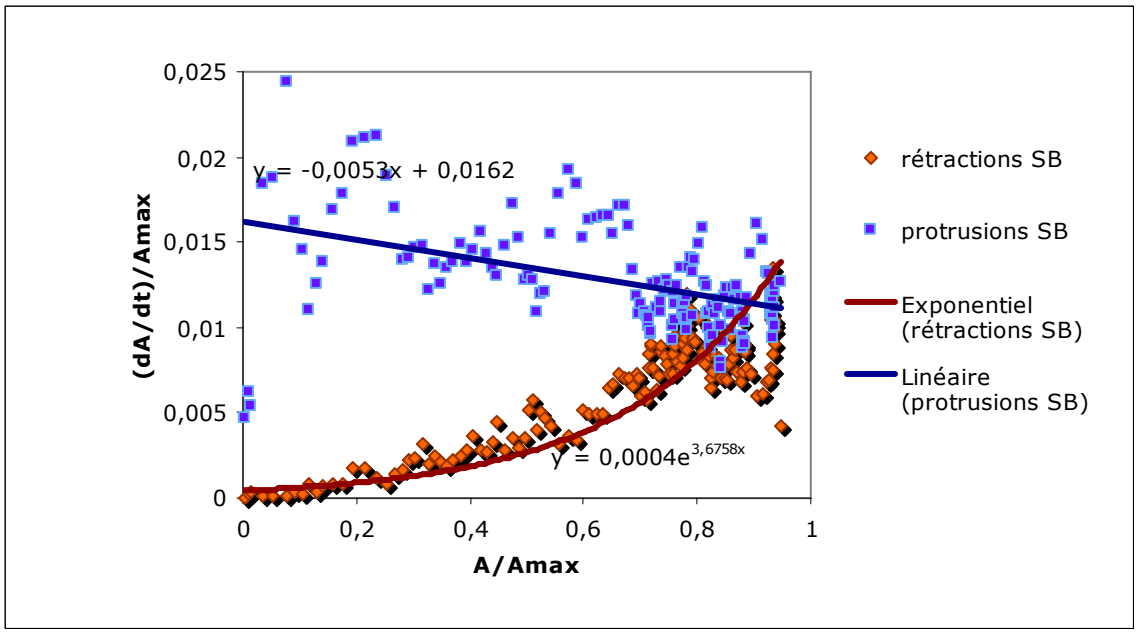


Figure 3.13 : Taux de protrusion et de rétraction moyens en fonction de l'aire moyenne de contact avec le substrat pour des cellules AX2 sur verre en SB. Les moyennes sont calculées après normalisation par l'aire de contact maximale de chaque cellule. Les points du taux de rétractions sont ajustés par une fonction exponentielle et ceux du taux de protrusions par une fonction affine.

Plus l'aire de la cellule est proche de son aire maximale, plus les rétractions sont importantes, ce qui est cohérent avec l'apparition de rétractions en fin d'étalement. La courbe semble suivre une loi exponentielle. A contrario, le niveau de protrusion ne semble pas clairement relié à l'aire de contact de la cellule, même s'il décroît légèrement quand l'aire augmente. On peut donc penser que c'est l'augmentation de la tension membranaire qui régule la fin de l'étalement et la transition vers la motilité, en déclenchant et contrôlant le niveau de rétraction dans la cellule.

3.1.3 Influence de la concentration en calcium sur l'activité périodique des protrusions et rétractions

Nous avons ensuite cherché à savoir de quoi pouvait dépendre l'activité périodique des cellules. Les travaux de S. Fache au laboratoire (Fache et al., 2005) ayant montré que l'augmentation de la concentration de calcium extracellulaire de 5µM à 1mM stimule d'un facteur trois environ la motilité induite par une contrainte hydrodynamique, en augmentant la

taille des protrusions et des rétractions, nous nous sommes intéressés à l'effet du calcium sur l'étalement cellulaire.

Tout d'abord, le calcium joue sur la cinétique de l'étalement. En effet, on voit sur les courbes moyennes d'étalement en milieu SB (figure 3.14, pointillés) et en milieu SB + 500µM $CaCl_2$ (figure 3.14, trait plein) que la présence de calcium augmente la vitesse initiale de l'étalement (de 2,3µm^2/s à 3,8µm^2/s pour la pente à l'origine des courbes). Par contre, l'aire totale atteinte à la fin de l'étalement ne varie pas de manière significative lorsqu'on ajoute du calcium au tampon.

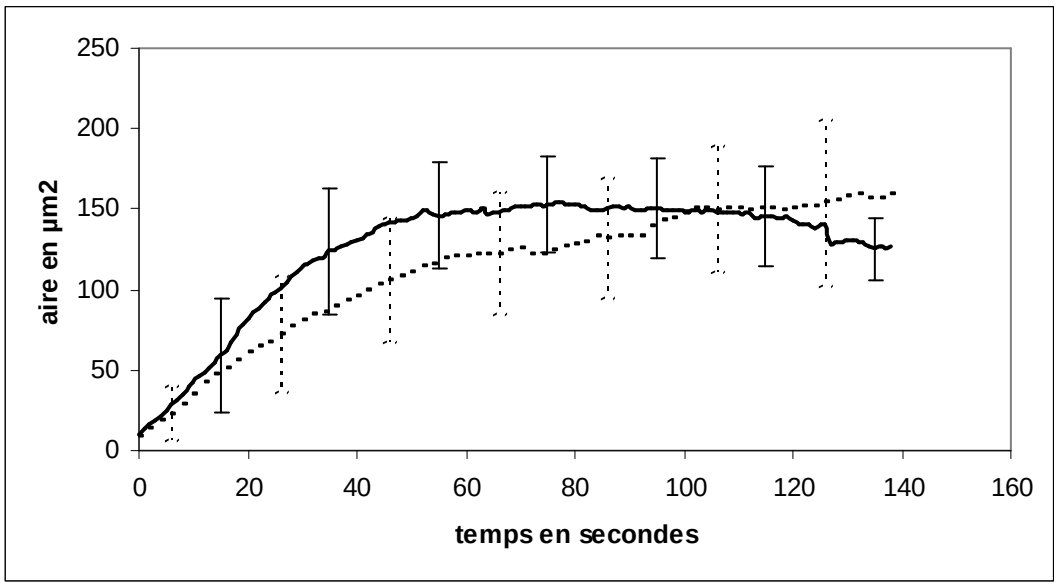


Fig 3.14 : Etalement moyen de cellules AX2 sur verre en tampon SB (pointillés) et SB + 500µM $CaCl_2$ (trait plein). Moyennes sur 14 cellules.

Nous avons vu qu'au début de l'étalement, la cellule ne fait que des protrusions et pas de rétractions. Donc si la cellule s'étale plus vite, c'est soit parce que les protrusions ont une surface plus importante, soit parce que les protrusions sont plus fréquentes en présence de calcium. Pour faire un choix entre les deux hypothèses, nous avons regardé la régularité des protrusions en présence de calcium en faisant la moyenne des courbes de protrusions en tampon SB + 500µM $CaCl_2$ (figure 3.15). Avant de faire la moyenne, les courbes individuelles ont été normalisées et alignées sur le premier pic comme pour les moyennes en tampon SB.

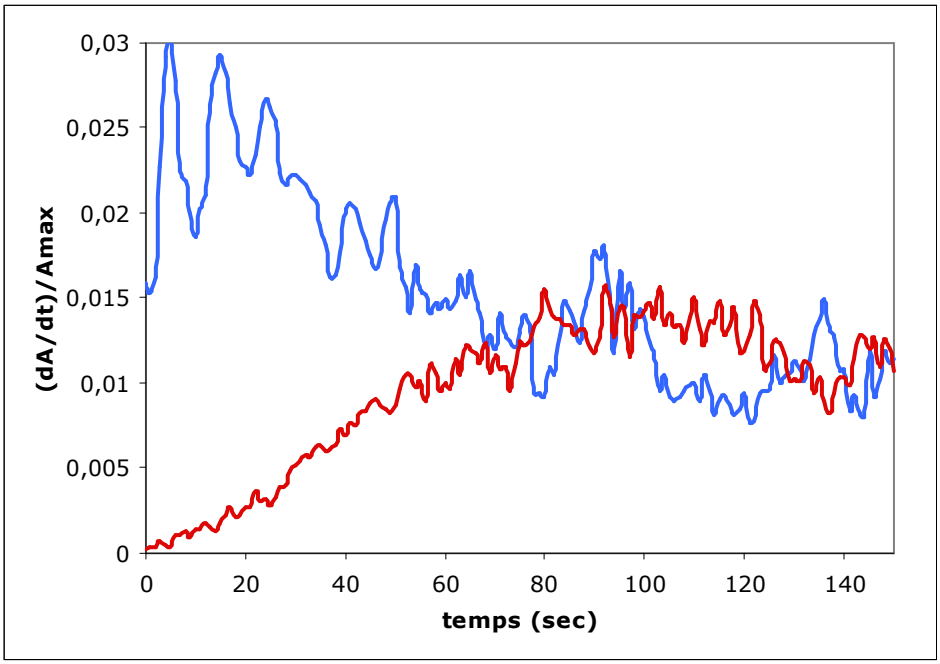


Fig 3.15: Protrusions et rétractions moyennes en tampon SB + 500µM $CaCl_2$: période d'oscillation : 7,6 ± 2,6s et 6,9 ± 2,6s respectivement pour les protrusions et rétractions.

Les oscillations sont toujours présentes, et si on mesure leur fréquence, on trouve 7,6 ± 2,6s et 6,9 ± 2,6s respectivement pour les protrusions et rétractions : il n'y a pas de différence significative avec les valeurs obtenues en tampon SB seul (*7,1 ± 2,3s et 6,2 ± 2,0s)*. Le calcium ne modifie donc pas la fréquence des protrusions ou des rétractions. Par contre, lors des 40 premières secondes de l'étalement, le niveau moyen des protrusions se situe autour de 2,5 % de l'aire totale par seconde, contre 1,5 % en tampon SB. L'amplitude des oscillations n'est en revanche pratiquement pas modifiée dans cette période, avec une amplitude moyenne d'un pic de 0,67 ± 0,24% /s en présence de 500µM $CaCl_2$, contre 0,55 ± 0,4% /s en tampon SB seul.

Le niveau moyen de protrusion est donc plus important en présence de calcium, du moins au début de l'étalement. Si on trace la somme des protrusions et la somme des rétractions entre l'instant initial et l'instant t, on retrouve cette différence de pente au début de l'étalement (figure 3.16).

La figure 3.16 nous indique de plus que lorsque les rétractions apparaissent, la pente des protrusions diminue nettement plus en tampon SB + 500µM $CaCl_2$ qu'en tampon SB. Après 140s, il n'y a pas de différence significative entre SB et SB + 500µM $CaCl_2$, que ce soit au

niveau des protrusions ou des rétractions. Dans les deux cas, la valeur de la pente des protrusions après 140s est pratiquement la même que celle des rétractions (les pentes valent respectivement 0,011 et 0,010 % /seconde en SB, 0,012 et 0,013% /seconde en SB + calcium pour les protrusions et les rétractions). Le calcium ne stimule donc pas les rétractions de la cellule. Ces résultats confirment qu'une fois étalée, une cellule peut toujours gagner de l'aire et en perdre, mais que globalement son aire de contact varie peu. Cela confirme également qu'à la fin de l'étalement, le mouvement de la cellule est contrôlé par les rétractions puisque le niveau des protrusions semble s'adapter à celui des rétractions. Enfin, le calcium stimule l'activité de protrusion de la cellule, mais n'influence pas directement l'activité de rétraction.

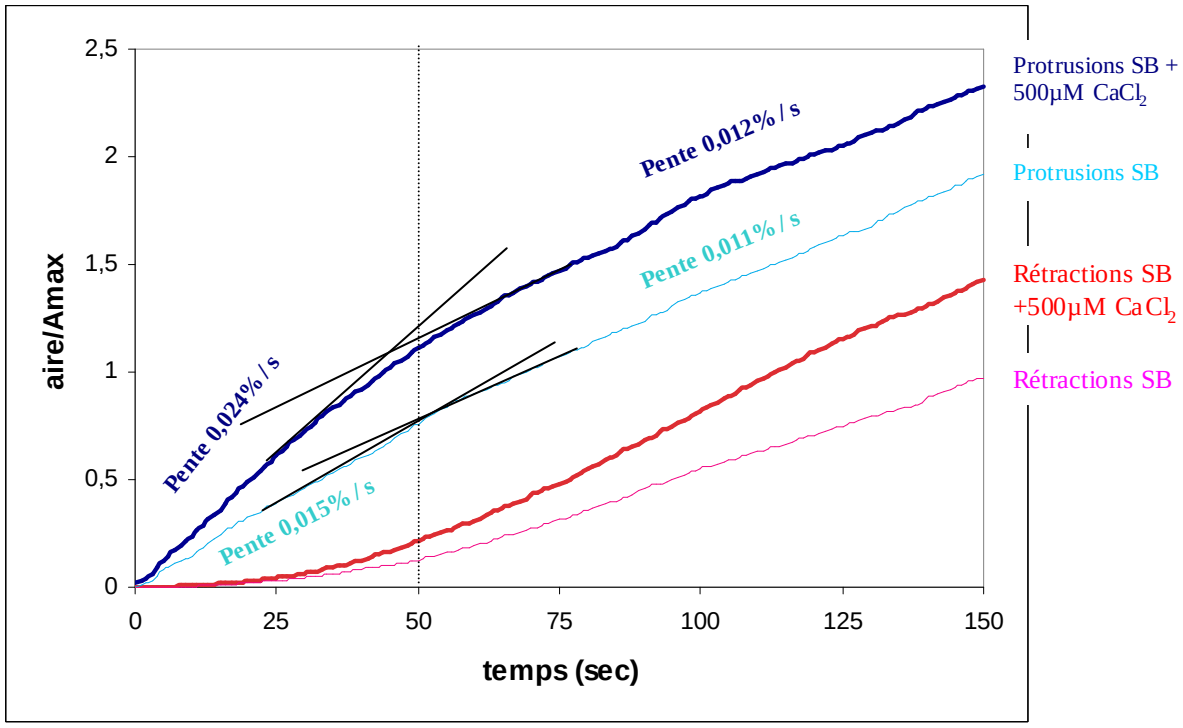


Fig 3.16 : Somme des protrusions moyennes et rétractions moyennes entre l'instant initial et l'instant t en fonction de t, cellules AX2 sur du verre, en tampon SB et SB+ 500µM $CaCl_2$. Les pentes moyennes des courbes de protrusions avant (t<50s) et après (t>50s) apparition des rétractions sont indiqués. Les tangentes aux courbes avant et après t=50s ont également été représentées (en noir) pour illustrer les changements de pente.

3.1.4 Influence de l'adhérence cellule-substrat sur l'activité périodique des protrusions et rétractions

Nous nous sommes ensuite demandés si la nature du substrat pouvait influencer la présence, la fréquence ou l'amplitude des oscillations observées lors de l'étalement. Nous avons réalisé des substrats de verre recouverts d'APS (3-AminoPropyltriethoxySilane). Ce traitement, décrit dans la partie Matériels et Méthodes, expose des groupements NH_2 en surface, qui sont chargés positivement à pH 6,2 (pH du tampon SB). Les travaux d'Emmanuel Décavé ont montré que l'énergie d'interaction avec le substrat est augmentée d'un facteur trois dans ces conditions (Decave et al., 2002). Les courbes moyennes d'étalement sur cette surface en tampon SB et SB + 500µM $CaCl_2$ sont données sur la figure 3.17. Les vitesses initiales d'étalement (2,5µm2/s et 4,4µm2/s en SB et SB + calcium) et les aires maximales atteintes (160 ± 20µm2) sont comparables aux valeurs obtenues sur du verre (respectivement 2,3µm^2/s et 3,8µm^2/s pour les pente à l'origine, et 150µm^2 environ pour les aires totales). La cinétique de l'étalement n'est donc pas modifiée par le traitement à l'APS.

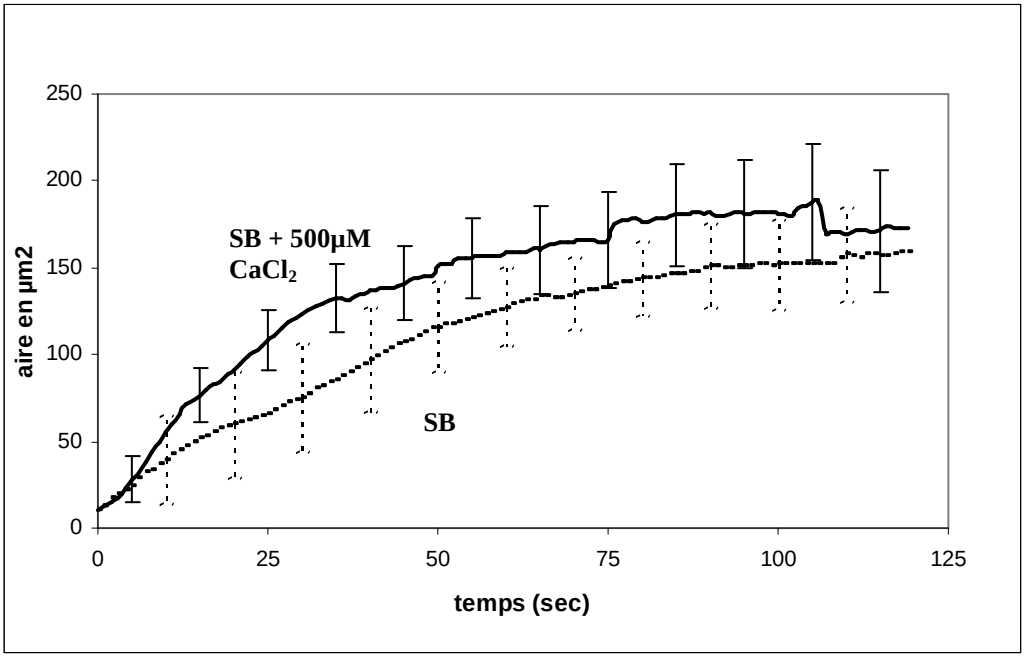


Fig 3.17 : Etalement moyen de cellules AX2 sur verre traité à l'APS, en tampon SB (pointillés), et SB + 500µM $CaCl_2$ (trait plein). Moyennes sur 15 cellules.

La courbe des protrusions moyennes fait toujours apparaître des pics assez régulièrement espacés (voir figure 3.18). En revanche, à la fin de l'étalement, le niveau moyen et

l'amplitude des protrusions sont fortement réduits par rapport au substrat en verre. De même le niveau des rétractions reste très bas tout au long de l'enregistrement. On peut penser qu'à la fin de l'étalement, la cellule adhère fortement à la surface, et n'est pas capable de faire des rétractions efficaces, ce qui, d'après ce que l'on a vu, diminue sa capacité à émettre des protrusions.

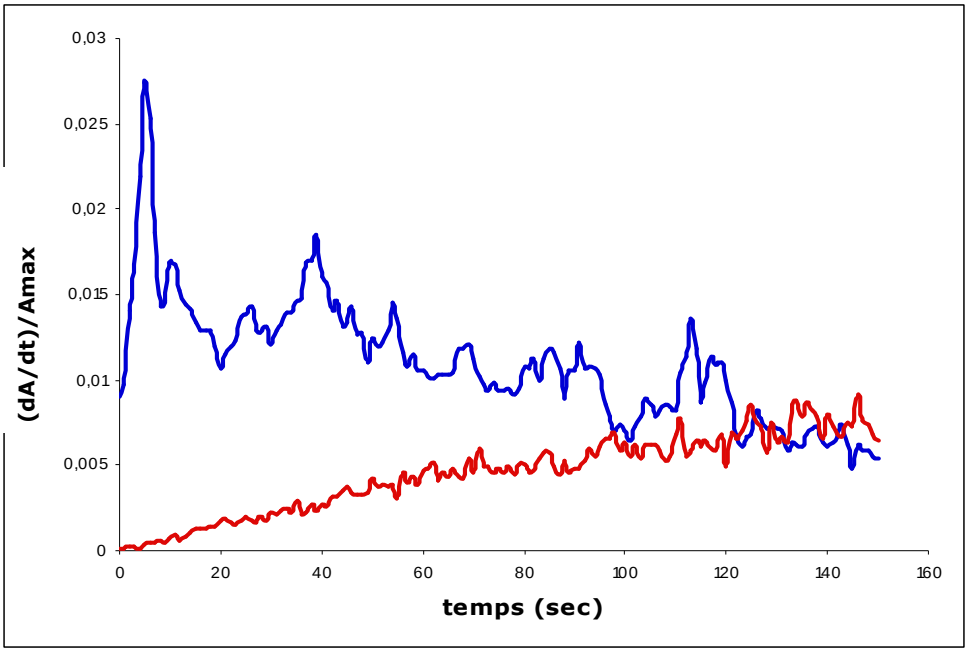


Fig 3.18: Courbes de protrusions et rétractions moyennes de cellules AX2 en tampon SB sur une surface de verre traitée à l'APS. Moyennes sur 15 cellules.

En calculant la période moyenne des protrusions sur APS, on obtient : 10,2 ± 4,0s en SB et 7 ± 2,8s en SB + 500µM $CaCl_2$. Compte tenu de l'incertitude des mesures, ces valeurs ne différent pas significativement de celles obtenues précédemment (7,1 ± 2,3s et 7,6 ± 2,6s pour les protrusions en SB et SB + 500µM $CaCl_2$ sur verre). Pour les rétractions, il est plus difficile de conclure car le bruit devient important par rapport à l'amplitude des pics. Mais des pics semblent toujours exister. Donc la nature plus ou moins adhésive du substrat ne semble influencer ni l'existence ni la fréquence des oscillations observées lors de l'étalement.

En conclusion, l'effet du calcium et de la nature plus ou moins adhésive du substrat sont résumés sur la figure 3.19, qui donne les valeurs moyennes des protrusions et des rétractions au début de l'étalement et à la fin de l'étalement, en pourcentage de l'aire totale atteinte par seconde.

Cette figure nous permet de résumer les conclusions obtenues : le calcium augmente le niveau moyen des protrusions lors de l'étalement jusqu'à l'apparition des rétractions, mais pas après. L'augmentation de l'adhérence ne change pas le niveau de protrusion au début de l'étalement, mais affecte l'amplitude des rétractions. Enfin, en fin d'étalement, les rétractions limitent la valeur des protrusions.

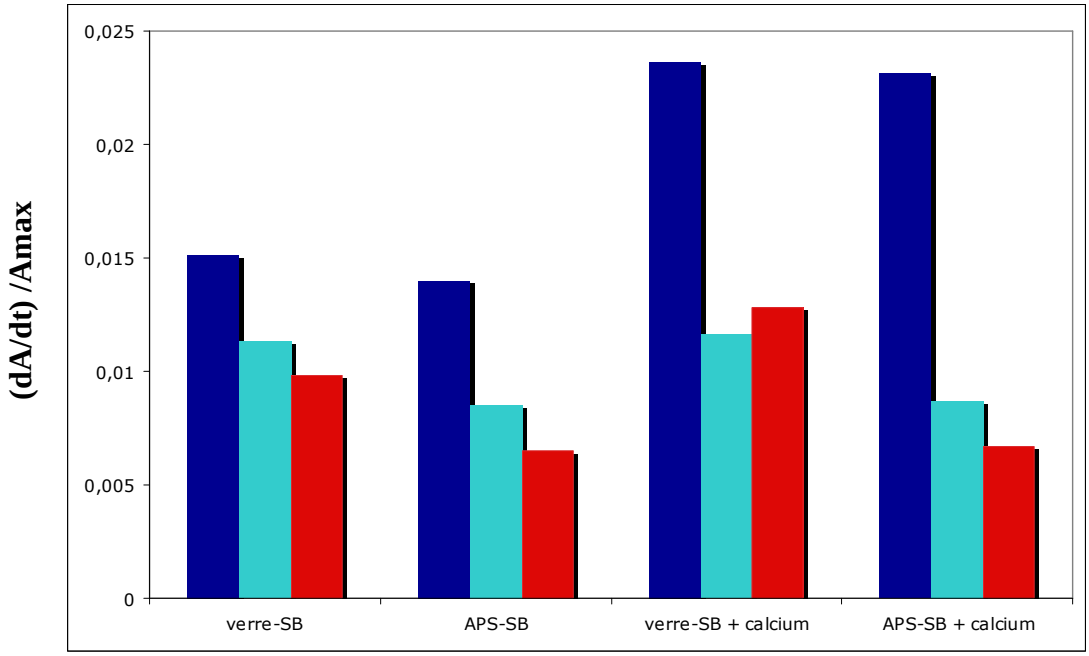


Fig 3.19 : Valeurs moyennes des protrusions au début de l'étalement (t<50s) (■), et des protrusions(■) et rétractions(■) à la fin de l'étalement (50s<t>100s), en fraction de l'aire maximale par seconde. Les valeurs sont données pour les expériences faites sur lamelles de verre et lamelles de verre traitées à l'APS, soit en tampon SB, soit en tampon SB+ 500µM $CaCl_2$.

3.1.5 Polarisation de l'étalement

Définition d'un pseudopode

Nous avons vu précédemment que l'étalement n'est pas un processus continu et isotrope, mais qu'il se fait par des gains d'aire successifs suivant des directions privilégiées. Nous avons voulu étudier plus en détail cette polarisation de l'étalement. Dans la suite de cette partie, on appellera ces gains d'aire dans une direction particulière des pseudopodes, pour faire la différence avec le terme générique de ''protrusion'' employé jusqu'à présent. En effet, comme nous allons le voir dans la suite, plusieurs pics d'une courbe de protrusions peuvent

correspondre à un gain d'aire dans une même direction, et donc à un même pseudopode. Il faut tout d'abord définir ce que l'on entend par pseudopode. On prendra comme définition une expansion importante de l'aire de contact dans une direction donnée. Tant que l'expansion est supérieure à une valeur minimale (on prendra $0{,}5\mu m^2/s$ pour toute la cellule) et que la cellule gagne de l'aire dans la même direction (à ± 45° de la direction initiale), on considérera qu'il s'agit du même pseudopode.
On obtient donc deux critères pour classer les zones d'expansion d'aire, un critère de seuil de gain (critère C1) et un critère de localisation (critère C2). Ce fractionnement des aires gagnées suppose qu'il n'y ait qu'un pseudopode à la fois dans la cellule, ce qui est le cas le plus souvent mais pas toujours. Pour simplifier, quand un nouveau pseudopode démarre, on considérera donc arbitrairement que le précédent est terminé.

Pour observer les pseudopodes successifs, nous avons écrit un programme dans Image Pro Plus, qui, à partir d'intervalles de temps fixés par l'utilisateur, colore les aires gagnées au cours de chaque intervalle d'une couleur particulière. Quelques exemples d'images obtenues, ainsi que les courbes de protrusions correspondant aux cellules étudiées, sont données sur la figure 3.20.
Sur les images obtenues, les directions successives de l'étalement sont bien mises en évidence. On remarque qu'il peut y avoir plusieurs pseudopodes dans une même direction, séparés par une période de faible activité (voir les cellules B et C). On remarque également qu'avec les critères choisis, la durée d'un pseudopode est assez variable, mais s'étend la plupart du temps sur plus d'un pic de la courbe de protrusions.
La cellule arrive à se polariser rapidement après le contact, en quelques secondes. Mais la toute première direction prise n'est pas forcément la direction principale de l'étalement (voir le cas des cellules A ou C), ce qui nous indique que la cellule est capable de se polariser rapidement même en l'absence d'un gradient chimique extérieur, et est aussi capable de changer d'orientation facilement. Malgré ces changements d'orientation, la cellule conserve tout au long de l'étalement une ou deux directions principales et est globalement polarisée suivant ces directions.
Un autre élément montre que les cellules se polarisent très vite : sur les images de la figure 3.20, la zone de contact initiale est représentée en blanc. Dans les trois cas, les pseudopodes n'apparaissent pas tout autour de ce point, mais s'en éloignent, si bien que lors de l'étalement, le point de contact initial avec le substrat n'est pas un point central de la surface de contact de la cellule mais plutôt un point périphérique.

De plus, comme nous l'avons remarqué auparavant, ce point de contact initial est très souvent l'endroit d'où démarrent les rétractions.

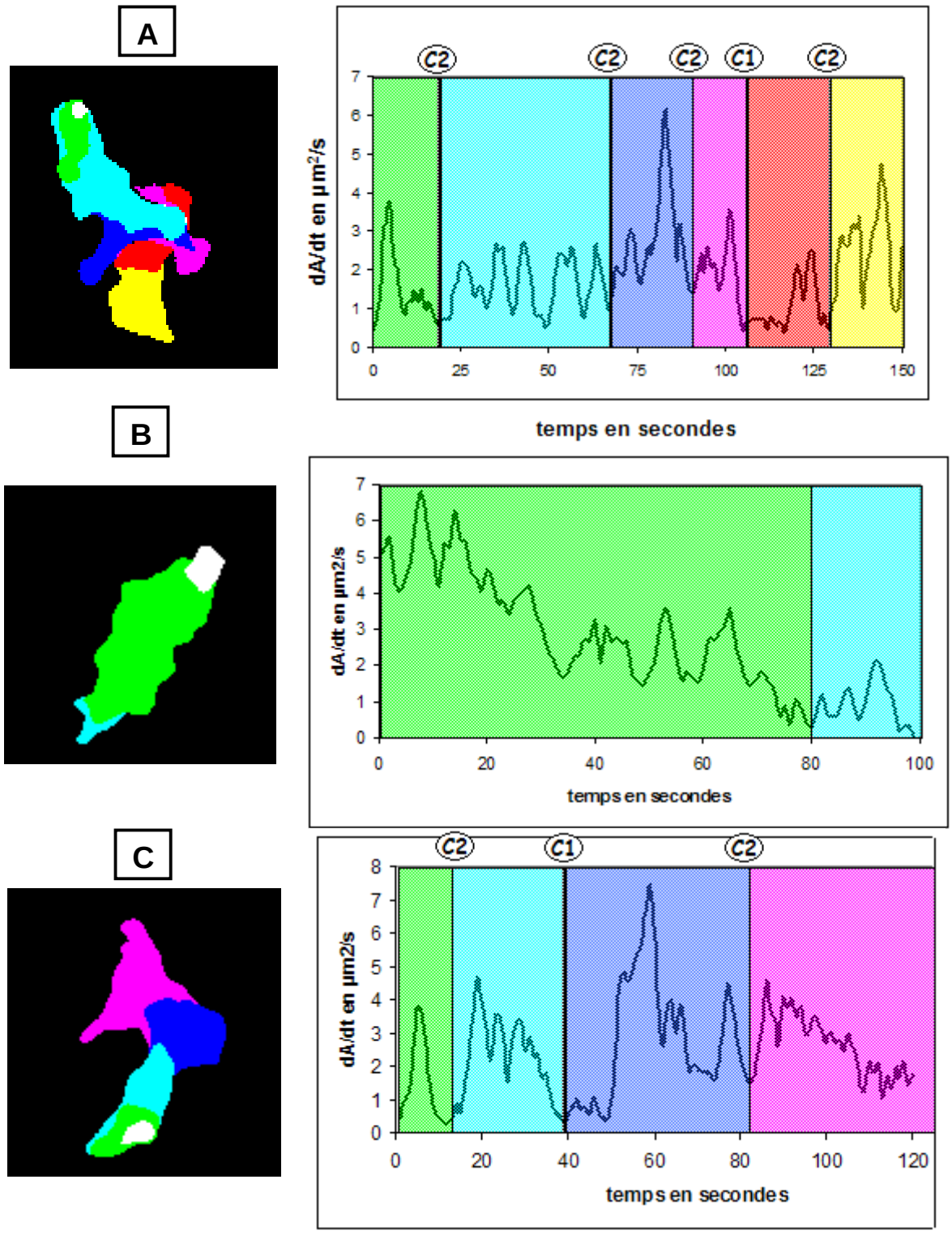


Figure 3.20 : Images montrant les pseudopodes successifs lors de l'étalement de cellules Ax2 sur verre, et les courbes de protrusions correspondantes d'après les deux critères C1 et C2 définis précédemment. Le point blanc sur les films correspond au point de contact initial. ***A*** *et* ***B*** *cellules Ax2 en tampon SB,* ***C*** *cellule en tampon SB+ 500µM* $CaCl_2$

Autre élément remarquable, comme on le voit sur la figure précédente, les différents pics ne sont pas tous indépendants. La plupart du temps, deux ou trois pics, voire plus, correspondent à une protrusion émise dans la même direction. Enfin, le fait que les pics de protrusion ne paraissent pas tous indépendants, puisque plusieurs pics correspondent à une activité dans une même direction, suggère qu'au-delà de l'apparition périodique des pics il y a une autre activité importante pour l'étalement, voire pour la motilité. Elle correspondrait à la « durée de vie » d'un pseudopode, temps moyen que met la cellule pour remettre en cause la direction dans laquelle elle s'étend. Néanmoins, nous n'avons pas étudié en détail la distribution temporelle de ces pseudopodes, le phénomène paraissant moins régulier que pour les pics de protrusion.

Mise en évidence de lamellipodes dans la zone de rétraction

Un autre élément des films nous donne des informations sur la polarisation des cellules : à la fin de certains films, on voit apparaître au niveau des zones de rétraction des zones plus sombres que le reste de la cellule. De telles zones sont parfois aussi présentes au cœur de la cellule, sous forme de petites taches (figure 3.21). Compte tenu du mode de microscopie utilisé pour réaliser ces images, ces zones sombres peuvent avoir plusieurs origines : soit dans ces zones la membrane est plus proche de la surface que dans les autres régions, soit ces zones contiennent plus de matière que dans le reste de la cellule, ce qui rend la région plus opaque. Pour confirmer la localisation de ces zones au niveau des rétractions, et tester l'influence de la nature du substrat sur ces zones noires, j'ai étudié ces zones sur des surfaces de verre traitées au 3-AminoPropyltriethoxySilane. Ce traitement augmente l'adhésion et diminue le niveau moyen de rétractions, comme on l'a vu.

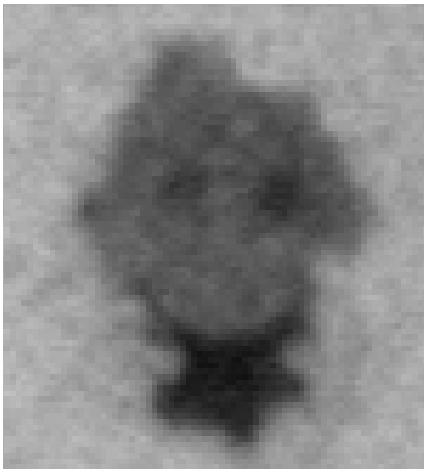


Fig 3.21 : Image extraite de l'étalement d'une cellule AX2, montrant la présence de zones très sombres à l'arrière de la cellule mais aussi au cœur de celle-ci sous forme de petites tâches.

Nous avons déterminé la proportion de cellules présentant de telles zones noires lors d'étalements sur APS et sur verre. Ces évènements sont beaucoup plus fréquents sur APS, comme on le voit sur la figure 3.22. En effet, près de 70 % des cellules présentent de telles zones sur APS, contre seulement 30 % sur verre. De plus, ces zones sont en moyenne plus grandes sur APS (elles occupent en moyenne jusqu'à 17,3% de l'aire de contact total, contre 8,3% sur verre). Le fait d'ajouter du calcium ne modifie pas ces observations. Il pourrait s'agir de zones fortement adhérentes où la cellule exerce des forces pour se contracter, sans parvenir à se détacher du substrat. De ce fait la tension membranaire serait importante et l'épaisseur de la cellule à cet endroit faible. Des zones de ce type ont été observées par le laboratoire de Gingell (Owens et al., 1988) et semblent dépendre des interactions entre la cellule et le substrat.

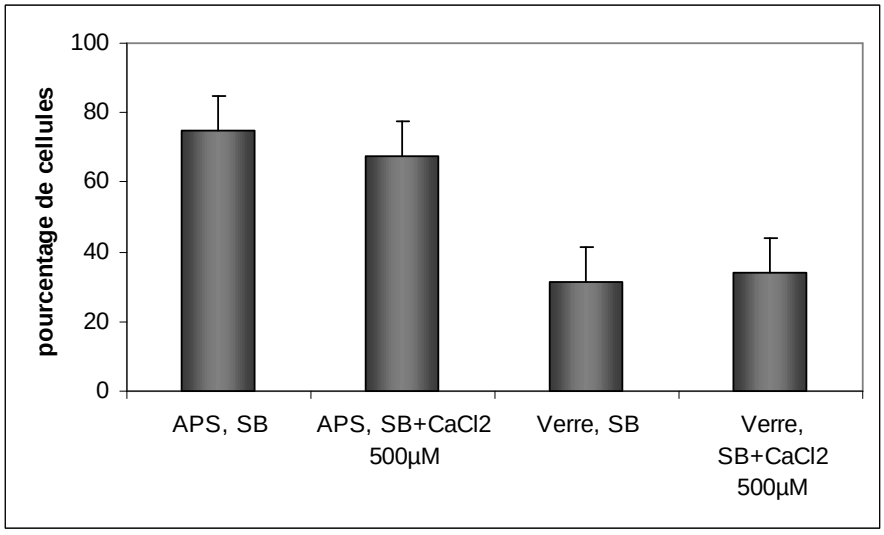


Fig 3.22 : Pourcentage de cellules ayant des zones noires lors de l'étalement en fonction du substrat et du tampon.

Rôle de la PI3-kinase dans la polarisation et l'étalement cellulaire.

Nous nous sommes demandés de quoi pouvait dépendre la polarisation cellulaire. La signalisation liée au PIP_3 est impliquée dans plusieurs processus où la cellule doit se polariser. Par exemple, comme on l'a vu, Emmanuel Décavé a montré que l'orientation des cellules sous flux dépendait d'une signalisation impliquant le PiP_3 via les PI3-kinases. Pour tester l'influence du PiP_3 sur l'étalement cellulaire, nous avons utilisé un inhibiteur des Pi3-kinases, le LY294002 (figure 3.23).

La vitesse initiale d'étalement diminue linéairement avec l'ajout de LY294002. On passe de 2,8µm2/s en l'absence de LY294002 à respectivement 2,1 et 0,6 µm2/s à des concentrations de 10 et 30µM. En revanche, jusqu'à 10µM, l'aire totale atteinte par la cellule n'est pas modifiée. A cette concentration, l'activité périodique des protrusions et des rétractions ne semble pas non plus perturbée (figure 3.24). L'ajout de 10µM de LY294002 n'a donc qu'une faible influence sur la cinétique d'étalement des cellules AX2.

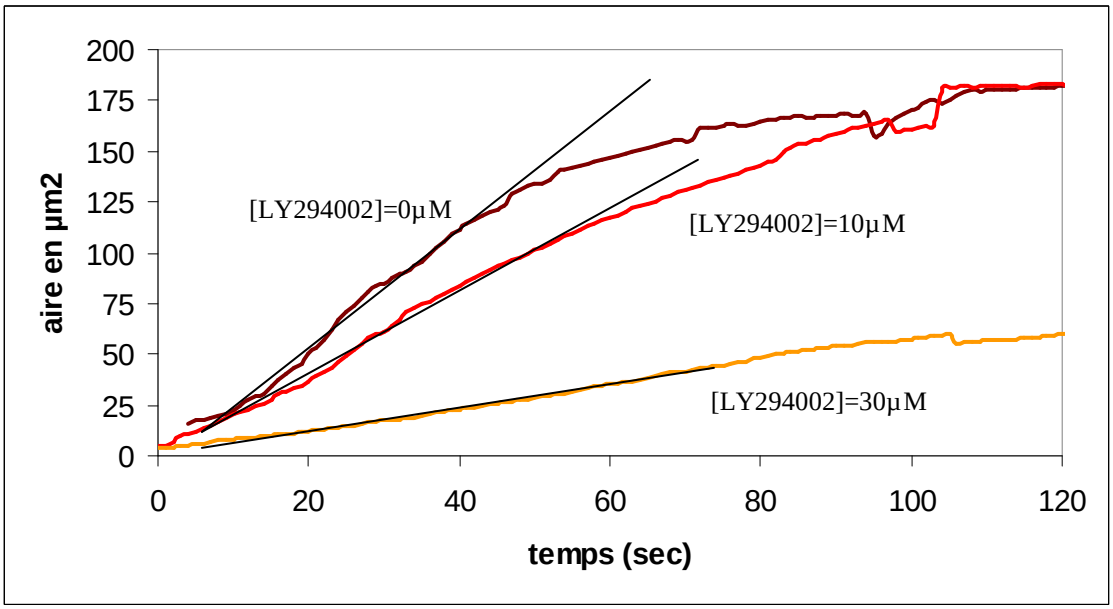


Fig 3.23 : Etalement moyen de cellules AX2 sur verre à différentes concentrations de LY294002. Les pentes initiales sont respectivement de 2,8 , 2,1 , et 0,6 µm^2/s pour des concentration en LY294002 de 0, 10 et 30µM.

Nous nous sommes ensuite demandés si la présence de l'inhibiteur modifiait la morphologie des cellules lors de l'étalement. Pour le savoir, nous avons fait le même traitement que pour la figure 3.20 pour des cellules en absence de LY294002 et en présence de 10µM de LY294002 (figure 3.25). En absence de LY294002 (figure 3.25A), l'étalement est bien polarisé comme décrit précédemment. L'ajout de l'inhibiteur supprime la polarisation des cellules. Des pseudopodes sont établis dans toutes les directions autour du point de contact initial.

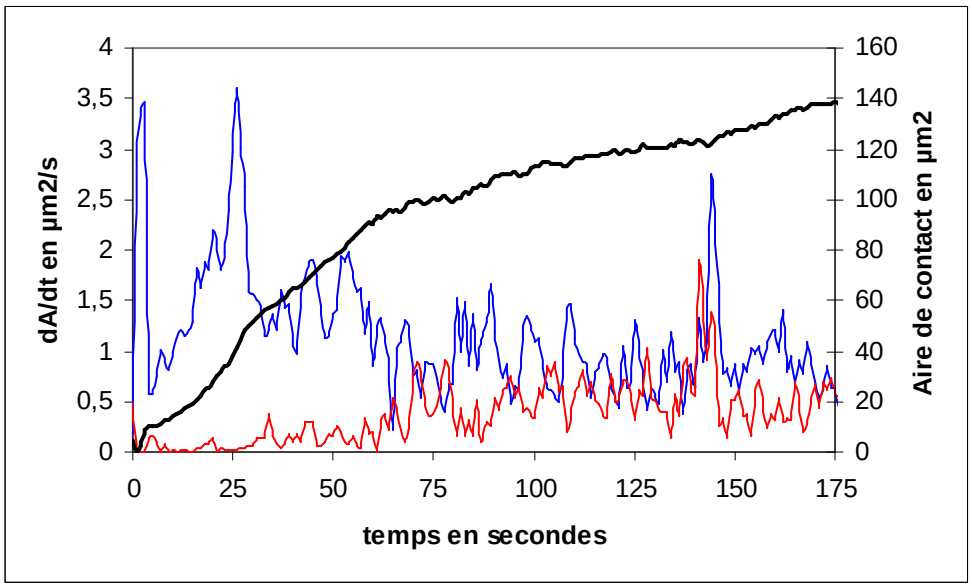


Fig 3.24 : Cellule AX2 s'étalant en présence de 10µM de LY294002 sur une surface de verre. Aire de contact en noir, protrusions en bleu, rétractions en rouge. Pour cette cellule, les protrusions ont une période moyenne de 7,6 ± 2,1s

En conclusion, en présence de 10µM de LY294002, les cellules sont capables de s'étaler, mais la polarisation de l'étalement a disparu. L'étalement polarisé des cellules est donc lié à l'action des PI_3-kinases. A des concentrations plus importantes de LY294002, la cinétique d'étalement est perturbée. Cela pourrait être lié à une moindre polymérisation de l'actine du fait d'une concentration en PIP_3 plus faible, ou à une toxicité globale du produit ou du solvant utilisé (DMSO).

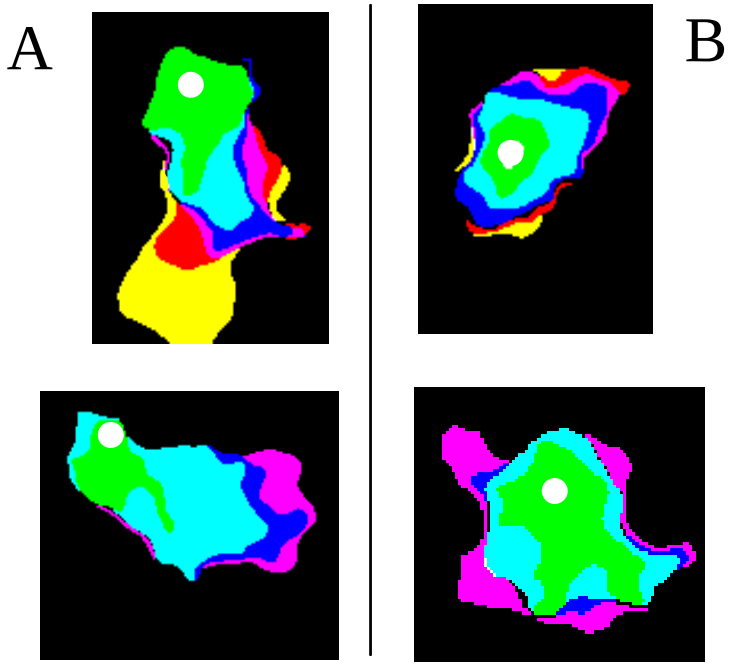


Fig 3.25 : Pseudopodes successifs lors de l'étalement de cellules Ax2. Les pseudopodes sont isolés selon les critères décrits précédemment, puis colorés par ordre d'apparition en vert, bleu clair, bleu, violet, rouge et jaune. Le point blanc sur chaque image correspond au point de contact initial de l'étalement ***A*** *: tampon SB + 0,25% DMSO (contrôle).* ***B*** *: tampon SB + 10µM LY294002.*

3.2 Etude du rôle de la protéine Phg2 dans la motilité cellulaire.

3.2.1 Introduction

Lors de ma thèse, une partie de mon travail a consisté à caractériser le rôle de la protéine Phg2 dans la motilité cellulaire. Cette protéine a été identifiée par le groupe de P. Cosson (Université de Genève), dans un crible de mutants ayant un défaut de phagocytose de billes fluorescentes (Gebbie et al., 2004). Puis le gène codant pour Phg2 a été invalidé dans la souche sauvage DH1 par insertion recombinante pour obtenir une invalidation stable (phg2Δ). Ce gène code pour une protéine de 1389 acides aminés, qui comporte plusieurs domaines fonctionnels, notamment un domaine serine/thréonine kinase, un domaine de liaison aux petites protéines G de la famille Ras, et un domaine de liaison au PIP_2. La protéine possède également deux domaines riches en prolines (voir figure 3.26 et Matériels et Méthodes).

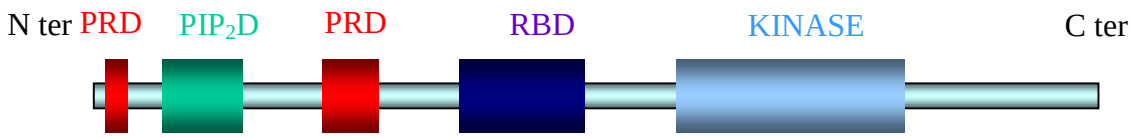


Fig 3.26: Principaux domaines de la protéine Phg2 : KINASE : serine/thréonine kinase, RBD : Ras Binding Domain, PRD : Prolin Rich Domain, PIP_2D : domaine de liaison au PIP_2.

Le groupe de F.Letourneur (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon) a construit des plasmides pour exprimer la protéine Phg2 dépourvue d'un de ces domaines, en fusion avec la Green Fluorescent Protein (GFP). Ces différentes constructions ont été décrites dans la partie Matériels et Méthodes. J'ai utilisé ces plasmides pour faire des complémentations dans le mutant nul phg2Δ.

Les travaux de ces deux groupes ont montré que la protéine est présente à la fois dans le cytosol, et au niveau de la membrane plasmique. Le groupe de F.Letourneur a montré que le recrutement de Phg2 à la membrane plasmique est indispensable pour la capacité de phagocytose des cellules, et qu'il se fait via l'interaction spécifique du domaine N-terminal de la protéine avec le $PI(4,5)P_2$ présent à la membrane.

Outre ce défaut de phagocytose, les cellules privées de la protéine Phg2 placées dans le milieu de culture HL5 adhèrent très mal aux surfaces de verre ou de plastique. En revanche, l'adhésion est normale en tampon SB. Mais dans ce tampon, les cellules phg2Δ présentent un défaut de motilité important : la vitesse des cellules en mouvement spontané est environ trois fois plus faible que celle des cellules sauvages. Lorsque ces cellules sont stimulées par un flux, leur vitesse augmente dans les mêmes proportions que celle des cellules sauvages, mais reste très inférieure en valeur absolue (5µm/min contre 15µm/min environ chez DH1, la souche parentale).

La fonction exacte de Phg2 n'est pas connue. La protéine pourrait jouer un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine au niveau de la zone de contact avec la surface. En effet, après quelques minutes d'adhésion, des petites structures riches en actine se forment au niveau de la zone de contact entre la cellule et le substrat (figure 3.27). Ces structures pourraient correspondre aux points de contact décrits dans l'introduction sous le nom d'actine foci. Ils sont de taille beaucoup plus importante chez un mutant phg2Δ que dans la souche parentale.

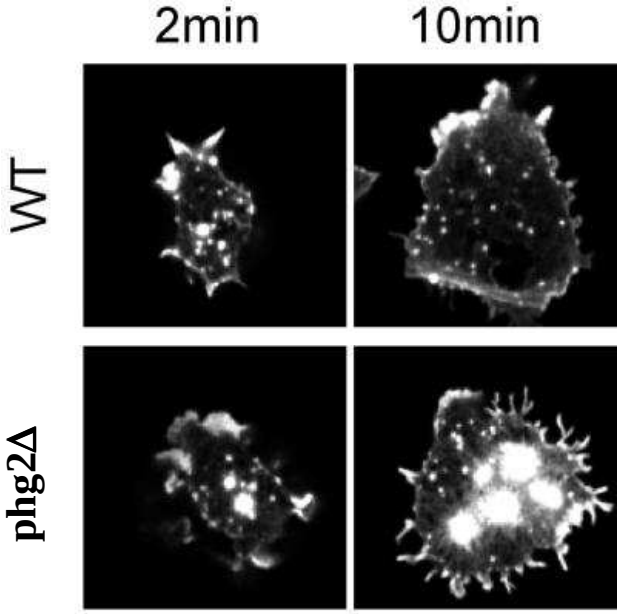


Fig 3.27 : Cytosquelette d'actine au niveau de la surface de contact cellule substrat, après 2 ou 10 mn d'adhésion sur une surface de verre en tampon phosphate. Les cellules sont fixées et l'actine marquée par la phalloidine. (Gebbie et al., 2004)

Nous avons voulu mieux comprendre le défaut de motilité de phg2Δ, et notamment connaître le rôle de chaque domaine de la protéine à l'aide des différentes constructions dont nous disposions. Nous avons dans un premier temps confirmé que le défaut de motilité de phg2Δ n'est pas lié à un défaut d'adhésion en tampon SB, puis nous nous sommes intéressés à l'étalement de ces cellules et notamment à leur capacité à se polariser.

Avant de caractériser le rôle de chaque domaine, nous avons commencé par comparer les niveaux d'expression de chaque plasmide dans les cellules complémentées. Ces niveaux sont révélés assez variables d'une construction à une autre, ce qui peut avoir de l'importance pour l'interprétation des résultats (voir figure 3.28).

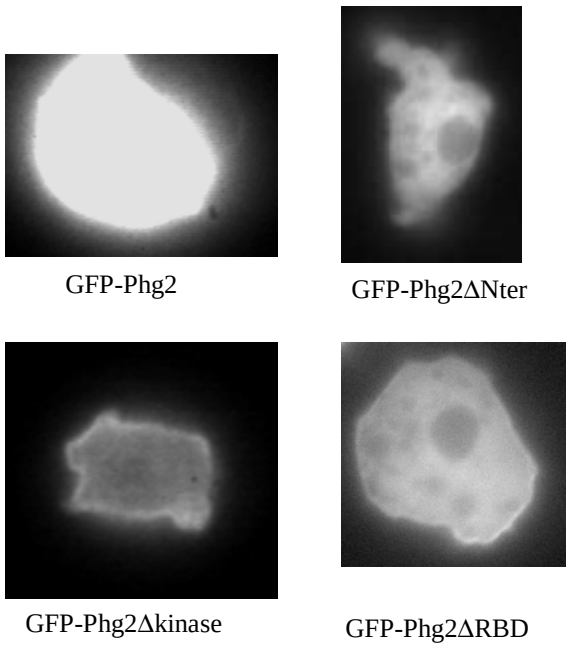


Fig 3.28 : Fluorescence de cellules phg2Δ exprimant la GFP en fusion avec Phg2 privée du domaine indiqué.Le temps d'exposition et le gain de la caméra sont les mêmes pour les quatre photos.

En particulier, la surexpression de la protéine Phg2 complète en fusion avec la GFP était très forte. Pour les autres souches, la fluorescence observée était équivalente d'une souche à l'autre, et les images données sur la figure 3.28 nous permettent de retrouver la localisation renforcée à la membrane décrite précédemment, sauf pour la souche exprimant GFP-Phg2ΔNter, dépourvue du domaine de liaison au PIP_2. Ce domaine de liaison est donc bien responsable de l'attachement à la membrane de Phg2.

3.2.2 Rôle des différents domaines de Phg2 dans l'adhésion cellulaire

La force d'adhésion des cellules sur une surface de verre a été déterminée grâce au montage expérimental décrit dans la partie 2.6 (Matériels et Méthodes). Ce montage permet d'appliquer un gradient de contrainte hydrodynamique sur un ensemble de cellules adhérant sur une surface. En observant le décollement des cellules, on peut déterminer la contrainte nécessaire pour détacher 50% des cellules en 10mn (notée $\sigma_{50\%}$). On assimile cette contrainte à la force d'adhésion des cellules avec la surface.

Tout d'abord, nous avons retrouvé le fait que l'adhésion en tampon SB n'est pas modifiée chez le mutant phg2Δ, puisque les $\sigma_{50\%}$ valent respectivement 1,65 Pa et 1,5 Pa pour DH1 et phg2Δ. En HL5, le défaut est bien présent, puisque la force d'adhésion du mutant est 10 fois plus faible que celle de la souche sauvage (figure 3.29).

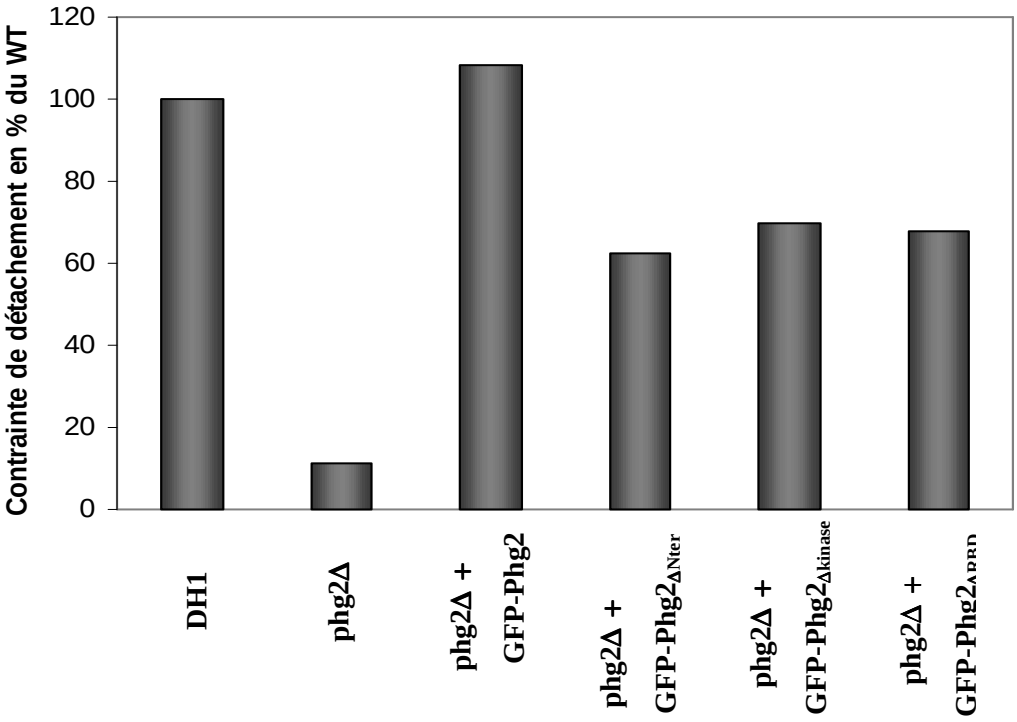


Fig 3.29 : Contraintes de détachement $\sigma_{50\%}$ en milieu HL5 de phg2Δ et des cellules phg2Δ complémentées, exprimées en % de la valeur des cellules parentales DH1.

Comme on le voit sur la figure 3.29, l'expression de la protéine complète GFP-Phg2 dans le mutant phg2Δ rétablit une adhésion normale, alors que les autres constructions incomplètes ne restaurent que partiellement le défaut, à environ 60% de l'adhérence de la souche sauvage. Cette différence pourrait être due au niveau d'expression de Phg2 dans les différentes

souches. Il est en tout cas difficile d'impliquer un domaine plutôt qu'un autre dans le défaut d'adhésion.

Néanmoins, ce défaut d'adhésion se manifestant en tampon HL5 et pas en tampon SB, il ne peut expliquer les problèmes des cellules phg2Δ pour se mouvoir en tampon SB.

3.2.3 Rôle des différents domaines de Phg2 dans la motilité induite par un flux hydrodynamique

Vitesse et directionalité

Pour poursuivre l'étude, nous avons cherché à savoir si les différentes constructions à notre disposition pouvaient complémenter le défaut de motilité de phg2Δ . Pour cela, nous avons mesuré la vitesse des cellules soumises à un flux hydrodynamique (contrainte de 2,4 Pa), selon le protocole décrit au chapitre 2.4 (Matériels et Méthodes). On détermine ainsi de manière statistique la vitesse moyenne des cellules soumises à un flux (figure 3.30) et leur orientation moyenne par rapport au flux (figure 3.31).

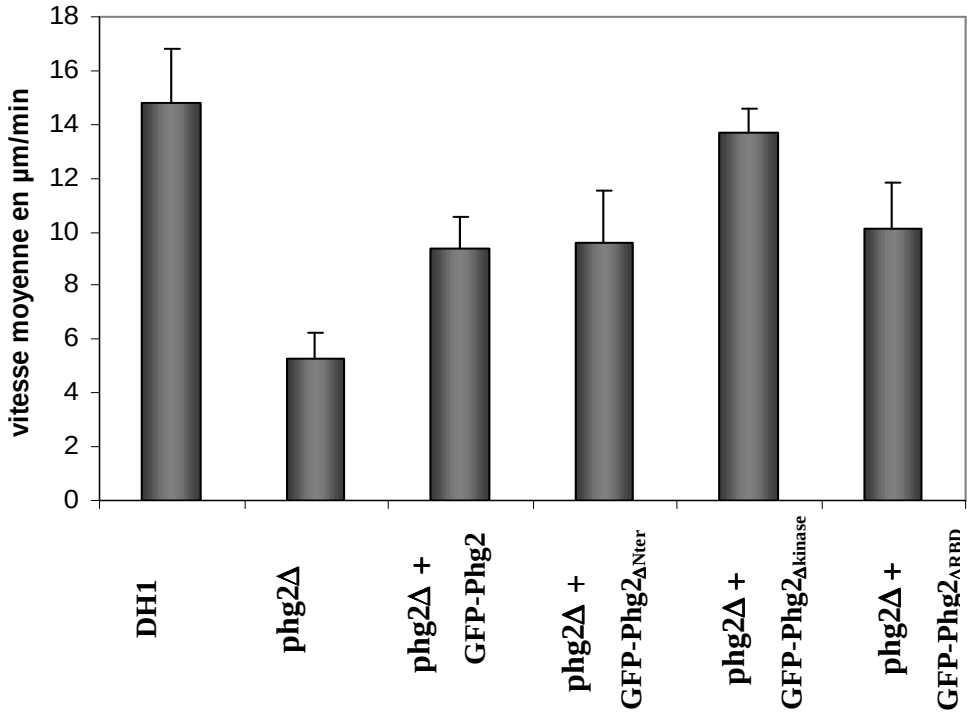


Fig 3.30 : vitesse moyenne des cellules DH1, phg2Δ et phg2Δ complémentées soumises à un flux (contrainte 2,4 Pa) en tampon SB + 1mM $CaCl_2$

Le défaut de motilité de phg2Δ est net sur la figure 3.30 : La vitesse de ces cellules est en moyenne trois fois moindre que celle de la souche parentale. Comme pour l'adhésion, l'expression d'une partie de Phg2 ou de Phg2 complète augmente la vitesse des cellules. Néanmoins, la protéine complète (phg2Δ + GFP-Phg2) ne complémente que partiellement le défaut. Les cellules complémentées les plus mobiles sont les cellules phg2Δ + GFP-Phg2Δkinase. Le domaine kinase de Phg2 n'est donc pas indispensable pour la motilité cellulaire telle qu'elle a été mesurée ici.

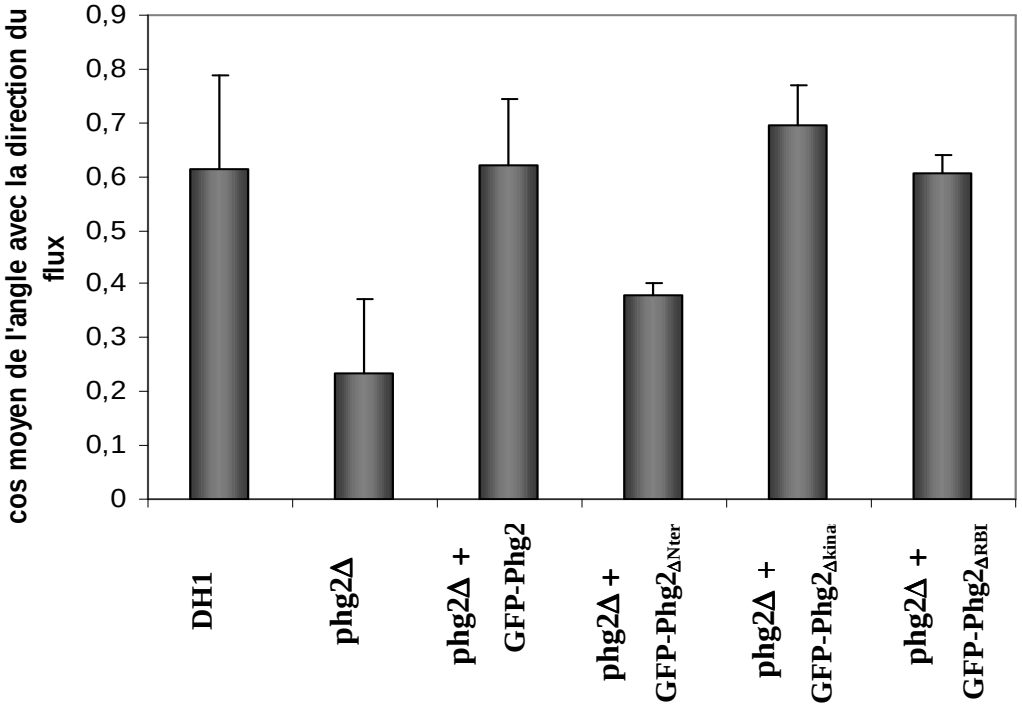


Fig 3.31: Directionalité moyenne des cellules DH1, phg2Δ et phg2Δ complémentées soumises à un flux (contrainte 2,4 Pa) en tampon SB + 1mM $CaCl_2$

D'autres informations sont apportées par la mesure de la directionalité des cellules, c'est-à-dire du cosinus moyen de l'angle que font les cellules avec la direction du flux. Les cellules de *Dictyostelium discoideum* sont naturellement sensibles à l'exposition à une contrainte hydrodynamique, et tendent à s'orienter suivant la direction de cette contrainte (Fache et al., 2005). De ce fait, la détermination de l'angle moyen que fait une cellule avec le flux, ou de son cosinus, nous renseigne sur la capacité de la cellule à sentir les forces et à y répondre de manière directionnelle. Or on voit sur la figure 3.31 que les cellules où le gène phg2 a été inactivé se polarisent moins par rapport au flux que les cellules parentales DH1 (cosinus plus faible donc angle avec le flux plus important). L'expression de la protéine Phg2 totale restaure

la directionalité du mouvement, de même que l'expression de la protéine Phg2 privée du domaine RBD ou du domaine kinase. Ce dernier résultat confirme que ce domaine n'est pas essentiel pour la motilité. En revanche, l'expression d'une protéine privée du domaine d'attachement au PIP_2 ne suffit pas pour restaurer une directionalité normale.

En résumé, on peut identifier deux défauts dans la motilité des cellules phg2Δ : un défaut de vitesse et un défaut d'orientation par rapport au flux. Le domaine kinase de Phg2 n'est pas essentiel pour la motilité cellulaire, par contre, le domaine de liaison au PIP_2 est important pour l'orientation des cellules sous flux. D'autre part, l'adhésion en milieu HL5 et la motilité en milieu phosphate sont deux phénomènes bien distincts : alors que l'expression de la protéine Phg2 entière complète le défaut d'adhésion de phg2Δ en HL5, la motilité n'est pas parfaitement rétablie en SB, et c'est l'expression de Phg2 privée du domaine kinase qui restaure totalement la motilité des cellules.

Morphologie des cellules sous flux

Suite à ces observations, nous avons voulu savoir si la faible vitesse des cellules phg2Δ pouvait être liée à une incapacité à émettre des protrusions ou des rétractions. Nous avons cherché à observer ces cellules sous flux, à fort grossissement (figure 3.32).
Ces observations se sont avérées assez délicates. Nous avons néanmoins pu tirer quelques conclusions : comme on le voit sur la figure 3.32, la cellule phg2Δ est tout à fait capable d'émettre des protrusions, mais elle ne se déplace pas. De plus, ces protrusions semblent apparaître à n'importe quel endroit de la cellule, adhèrent sur le substrat, puis au bout d'un certain temps la cellule les rétracte, ce qui indique qu'elle est également capable d'effectuer des rétractions. Cela signifie donc que ces cellules ont soit un défaut au niveau de la stabilisation des protrusions, soit un défaut de polarisation cellulaire.

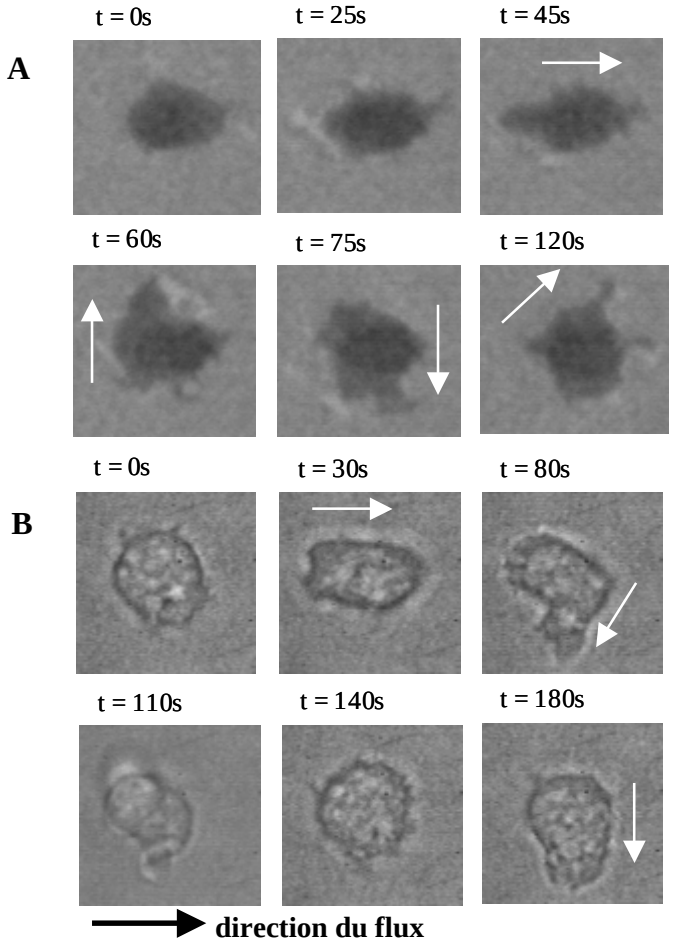


Figure 3.32 : Deux cellules phg2Δ soumises à un flux hydrodynamique de 2 Pa et observées soit en RICM (A) soit en microscopie à contraste de phase (B). Les flèches blanches indiquent les directions d'émission de protrusions.

Le fait que la cellule émette des protrusions dans toutes les directions pourrait indiquer qu'elle a des difficultés à s'orienter ou à se polariser en présence d'un flux.

Nous avons ensuite cherché à connaître la localisation de Phg2 dans une cellule motile. Pour cela, nous avons observé la fluorescence de cellules phg2Δ complémentées par GFP-Phg2Δkinase, cette construction ayant l'intérêt d'avoir une bonne fluorescence et de restaurer la motilité des cellules phg2Δ.

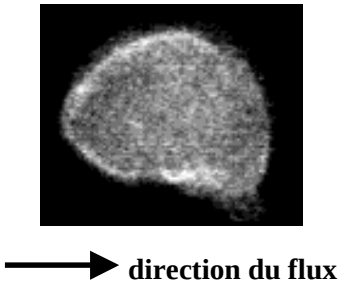


Fig 3.33 : Fluorescence de cellules phg2Δ *+ GFP-Phg2Δkinase soumises à un flux.*

On trouve de la fluorescence sur tout le pourtour de la cellule, mais cette répartition n'est pas homogène. Il existe des zones de fluorescence plus ou moins importante, mais il ne nous a pas été possible de relier leur présence à l'apparition de zones de protrusions ou de rétractions, ou bien à l'orientation du flux.

Pour simplifier l'étude du mutant phg2Δ, nous avons donc décidé de nous intéresser à l'étalement des cellules phg2Δ et phg2Δ complémentées.

3.2.4 Rôle des différents domaines de Phg2 dans l'étalement cellulaire

Cinétiques d'étalement

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'étalement des cellules DH1 et phg2Δ (figure 3.34). Les vitesses d'étalement des cellules et les aires maximales atteintes ne sont pas significativement différentes. Pour quantifier cela, les cinétiques moyennes d'étalement de la figure 3.34 ont été ajustées par des fonctions A_{max} tanh (αt). On obtient A_{max} = 91µm^2 et α = 0,016s^{-1} pour DH1, et A_{max} = 98µm^2 et α = 0,012s^{-1} pour phg2Δ. En l'absence de Phg2, les cellules sont donc capables d'émettre des protrusions et de s'étaler.

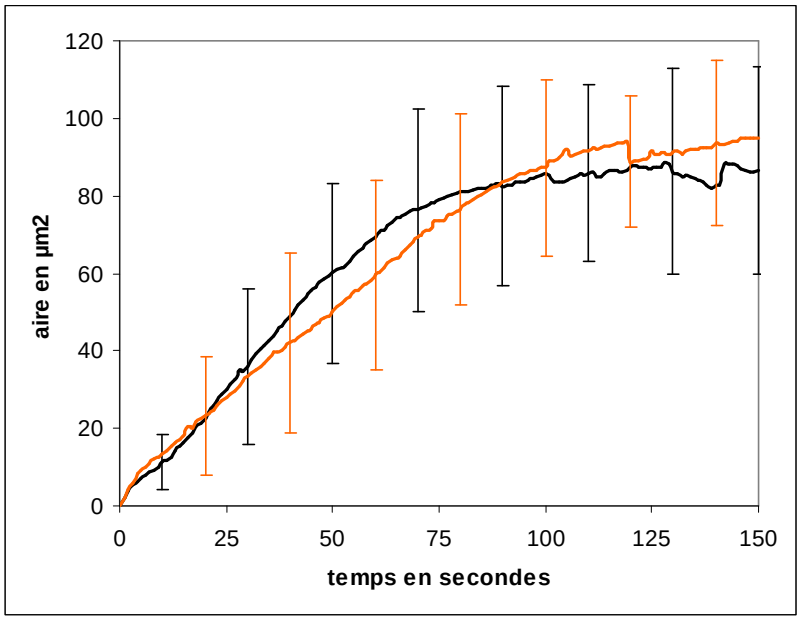
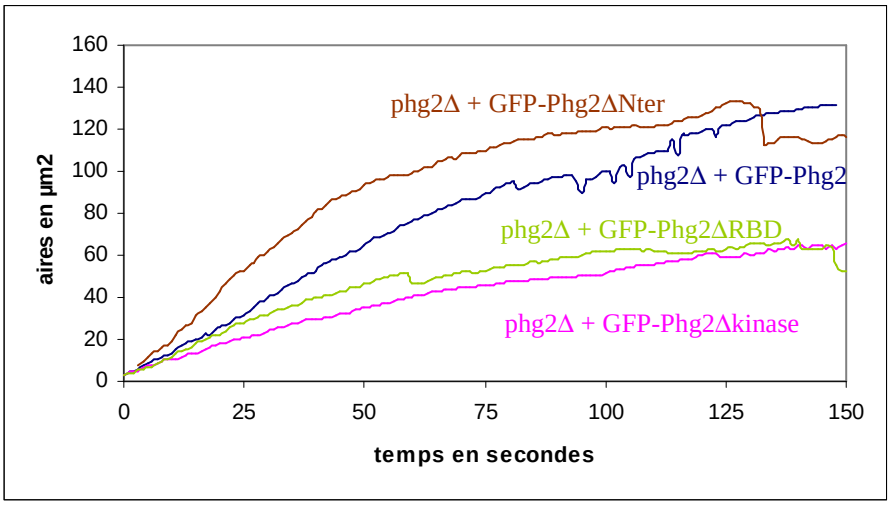


Fig 3.34: Etalement moyen des cellules DH1 (noir) et phg2Δ *(orange) sur verre en tampon SB + 500µM $CaCl_2$. Moyennes sur 15 cellules, les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.*

En revanche, les cinétiques d'étalement des cellules phg2Δ complémentées par des protéines de fusion sont plus variables : les cellules exprimant Phg2 entière ou Phg2 privée du domaine

N-terminal ont une aire maximale un peu plus grande que les DH1. Mais surtout les cellules exprimant Phg2 privée du domaine kinase ou Phg2 privée du domaine de liaison aux protéines Ras atteignent une aire moindre que les cellules DH1 (figure 3.35). Ces différences ne sont pas corrélées avec les vitesses initiales d'étalement, puisque les cellules exprimant GFP-Phg2 sont les plus lentes des cellules complémentées. Ces différences entre cellules, alors que les cellules phg2Δ ont une cinétique d'étalement comparable à celle de DH1, pourrait être liée aux différences de niveau d'expression entre les constructions GFP.



	GFP-Phg2	GFP-Phg2ΔNter	GFP-Phg2Δkinase	GFP-Phg2ΔRBD
Amax (μm^2)	148	124	66	64
α (s^{-1})	0,009	0,019	0,012	0,018

Fig 3.35 : Etalement des cellules phg2Δ complémentées sur verre en milieu SB + 500µM $CaCl_2$. Le tableau donne les paramètres du fit des quatre courbes par une fonction Amax.tanh(αt).

Nous avons ensuite utilisé le programme décrit précédemment pour mesurer les aires gagnées et perdues par les cellules phg2Δ au cours de l'étalement. Des exemples de courbe pour phg2Δ et DH1 sont donnés sur la figure 3.36. On constate qu'en l'absence de la protéine Phg2, les cellules sont toujours capables de faire des rétractions. De plus, on peut remarquer au niveau des protrusions que les pics sont toujours régulièrement espacés (période de 6,1 ± 2,7s pour phg2Δ contre 7,2 ± 3,2s pour DH1 pour les cellules de la figure 3.36).

Les cellules phg2Δ n'ont pas de problème pour émettre des protrusions et des rétractions. L'origine de leur défaut de motilité doit donc être ailleurs. Si la cellule est capable d'émettre des protrusions et des rétractions normalement, mais qu'elle n'avance pas ou très lentement, cela peut signifier que les protrusions/rétractions émises ne sont pas efficaces, par exemple parce qu'elles n'ont pas lieu au bon endroit et/ou qu'elles ne sont pas stables.

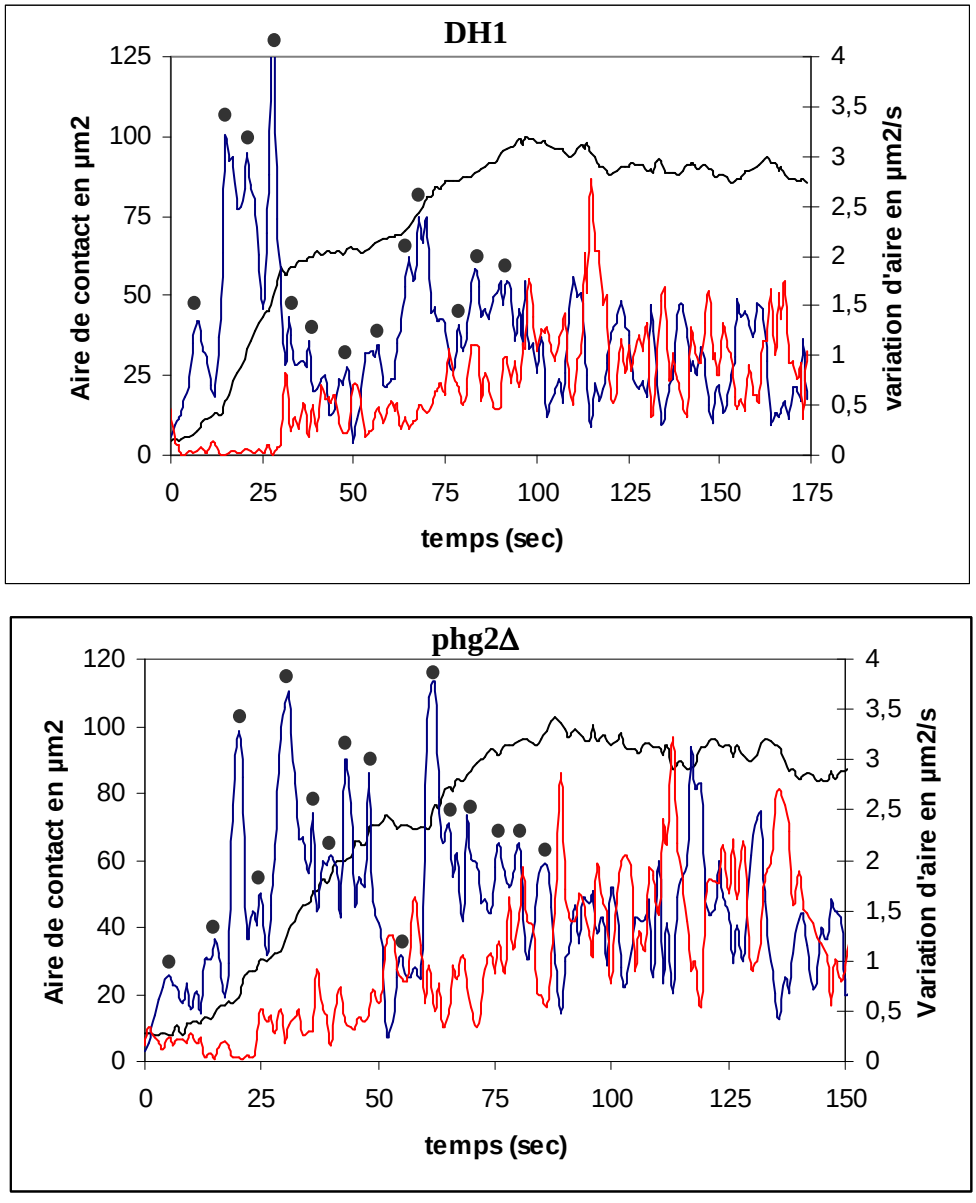


Fig 3.36 : Exemple de courbe d'étalement, de protrusions et de rétractions pour une cellule DH1 et une cellule phg2Δ sur verre en tampon SB + 500µM $CaCl_2$. Les principaux pics sont indiqués par des points noirs.

Morphologie des cellules lors de l'étalement

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la morphologie des cellules DH1 et phg2Δ lors de l'étalement. Des images de l'étalement de cellules DH1 et phg2Δ caractéristiques sont données sur la figure 3.37.

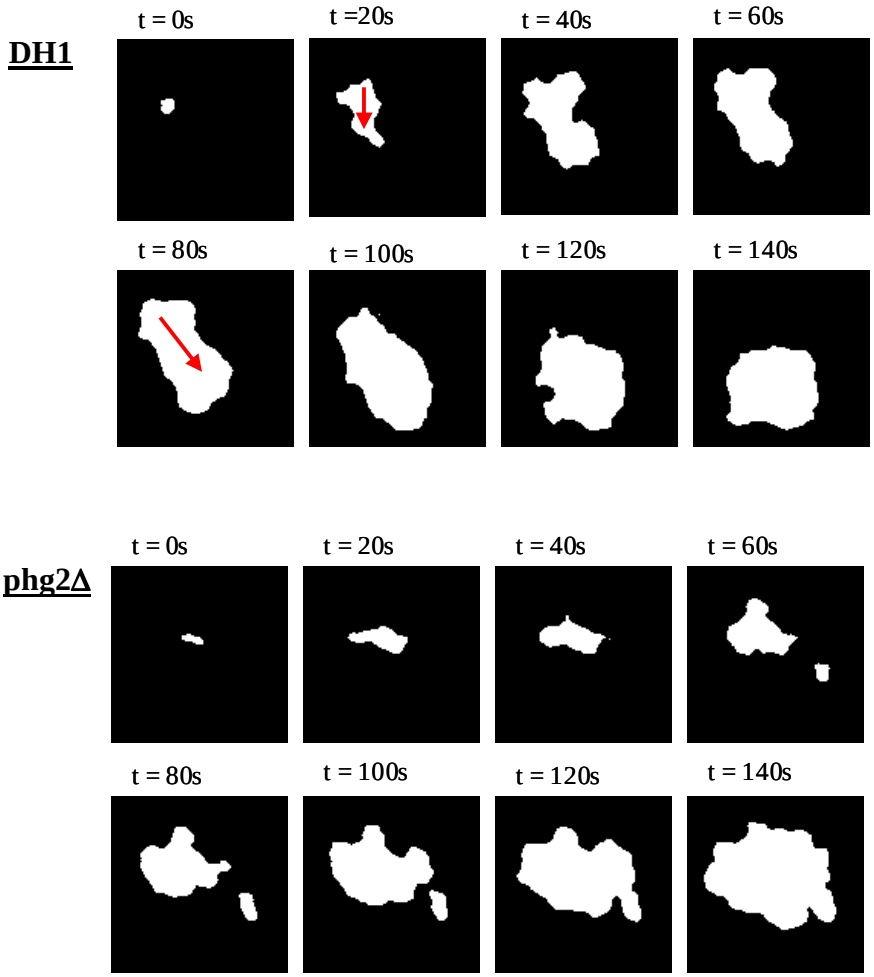


Fig 3.37: Exemple d'étalement d'une cellule DH1 et d'une cellule phg2Δ sur verre en tampon SB+ CaCl2 500µM. Les films ont été segmentés : l'aire de contact avec le substrat est en blanc et le reste de l'image est en noir. Les flèches rouges indiquent les directions privilégiées d'étalement de la cellule DH1.

Les cellules phg2Δ ont une morphologie très différente des DH1 lors de l'étalement : alors que l'étalement d'une cellule DH1, comme celui d'une cellule AX2, suit des directions privilégiées (voir à t = 20s ou t = 80s par exemple), l'étalement d'une cellule phg2Δ est

pratiquement isotrope. Autre différence, à la fin de l'étalement, ces cellules sont très peu actives comparées aux cellules DH1.

Les films montrant les aires gagnées et perdues lors de l'étalement pour les deux types de cellules confirment ces observations (figure 3.38).

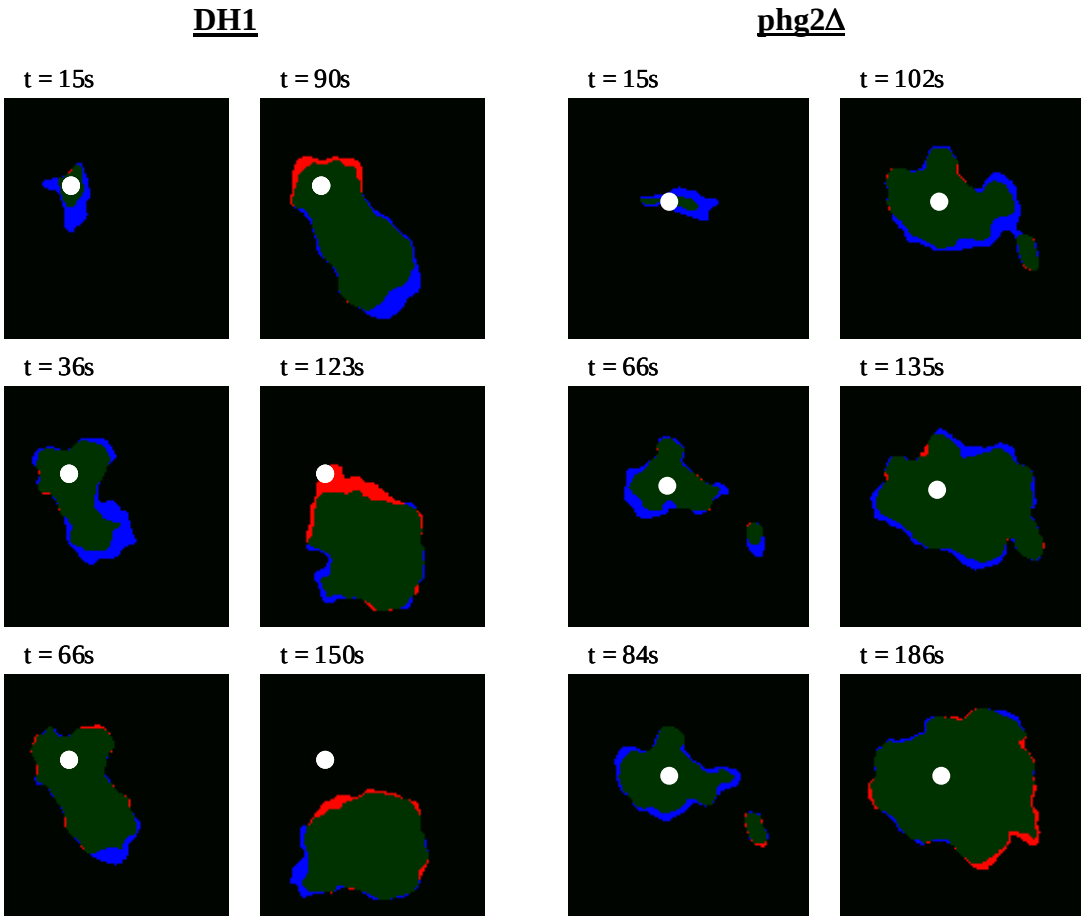


Fig 3.38: Aires gagnées et aires perdues lors de l'étalement d'une cellule DH1 et d'une cellule phg2Δ sur verre en tampon SB+ 500µM $CaCl_2$. Les aires gagnées sont représentées en bleu et les aires perdues en rouge. Pour une meilleure visibilité des zones, on a calculé les variations d'aires sur des périodes de trois secondes et non d'une seconde. La position du point initial de contact est représentée par un rond blanc.

La cellule DH1 se polarise sans problème. Les protrusions sont localisées à une extrémité de la cellule et sont plutôt étroites. Au contraire, pour la cellule phg2Δ, une grande protrusion se forme, et elle semble se développer sur pratiquement tout le pourtour de la cellule. La forme de cette protrusion est tout à fait particulière : elle est très ronde et ressemble à un ballon que l'on gonfle. De plus cette protrusion dure longtemps, entre 66 et 135s ici, alors que pour DH1

comme pour AX2 on voit plutôt se succéder des protrusions allongées toutes les 20 à 30 secondes environ.

Nous avons ensuite étudié la morphologie des cellules phg2Δ complémentées lors de l'étalement (figure 3.39). Aucune des surexpressions partielles ou totales de Phg2 ne rétablit entièrement le phénotype d'étalement des cellules DH1. Dans le détail, les cellules mutantes exprimant Phg2 totale ou Phg2 privée du domaine de liaison aux protéines Ras ont à peu près le même phénotype : ces cellules émettent des protrusions plutôt étroites et allongées comme celles de DH1. Les protrusions très larges et en forme de ballons ont disparu. Néanmoins, ces cellules ont toujours des problèmes pour se polariser. En effet les protrusions sont nombreuses, souvent de très courte durée, et sont réparties tout autour de la cellule. Contrairement à DH1 on peut d'ailleurs voir des protrusions distinctes apparaître simultanément à différents endroits du contour cellulaire (voir par exemple à t = 54s pour phg2Δ + GFP-Phg2 ou à t = 120s pour phg2Δ + GFP-Phg2ΔRBD). Les cellules exprimant Phg2 entière sont statistiquement un peu mieux polarisées que celles exprimant Phg2ΔRBD.
Enfin, les cellules exprimant Phg2 privée du domaine N-terminal ont une morphologie qui ressemble à celle des cellules phg2Δ.

Il semble donc y avoir deux paramètres à distinguer dans l'étalement des cellules DH1 ou phg2Δ : d'une part la forme plus ou moins ronde ou allongée d'une protrusion, et d'autre part la localisation des protrusions successives, et la fraction du contour cellulaire qu'elles occupent. Ce dernier élément traduit la polarisation de la cellule (protrusions concentrées d'un côté de la cellule, et rétractions de l'autre, ou protrusions présentes sur tout le pourtour de la cellule).

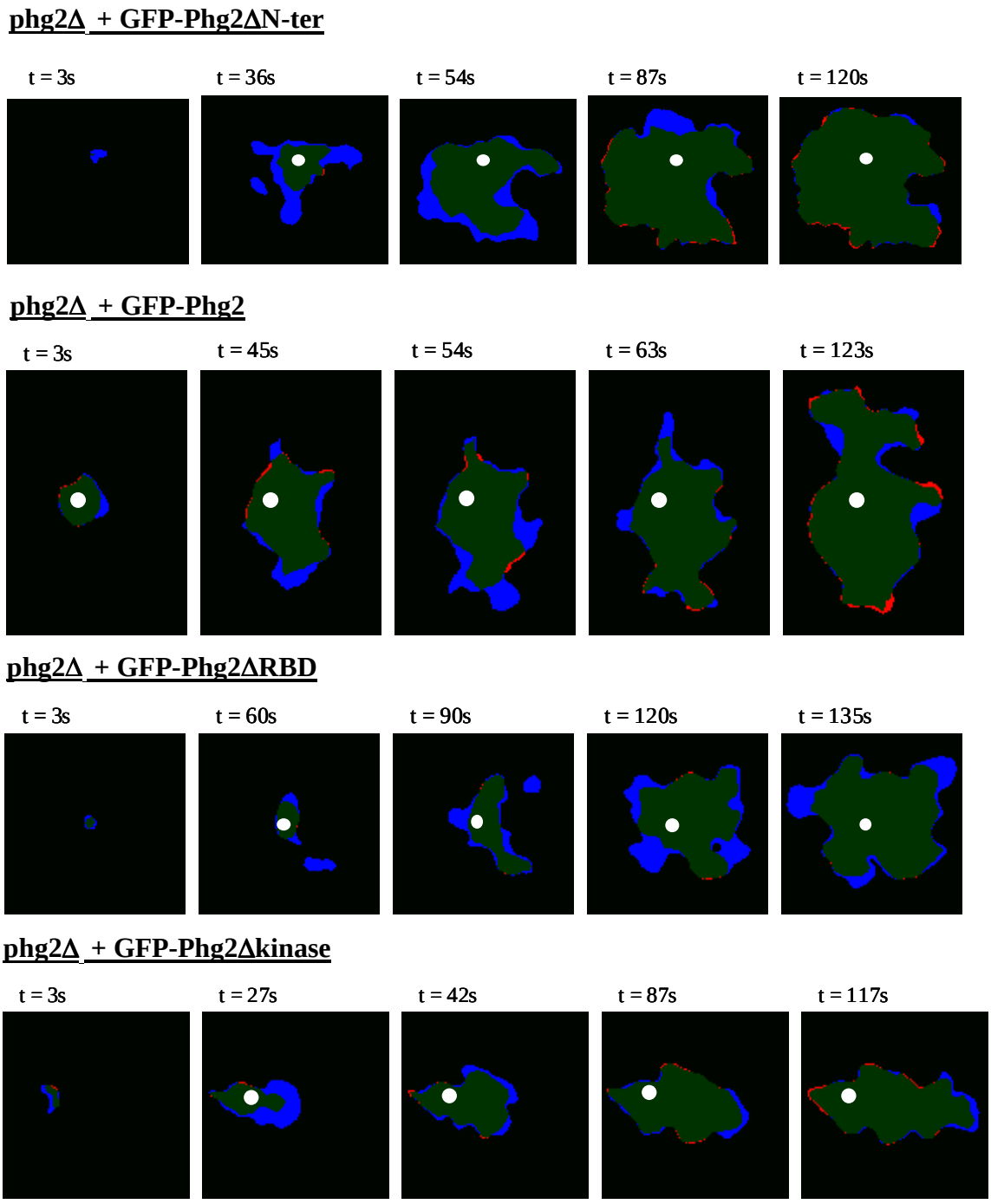


Fig 3.39 : Exemples d'étalement de cellules phg2Δ exprimant GFP-Phg2, GFP-Phg2Δkinase, GFP-Phg2ΔRBD ou GFP-Phg2ΔN-ter. La position du point initial de contact est représentée par un rond blanc.

La morphologie des cellules exprimant Phg2 sans le domaine kinase est très différente. Les protrusions ont toujours la forme ronde de ballons, avec une aire qui semble se propager autour d'un point, mais ces protrusions semblent tout de même moins larges que celles de phg2Δ. De plus, on voit à la fin de l'étalement que la cellule arrive à se polariser. En effet, à

partir de t = 117, on distingue bien les protrusions (en bleu sur la figure 3.39) qui se font à droite de la cellule et les rétractions (en rouge sur la figure 3.39) qui ont lieu plutôt à gauche de la cellule.

La figure 3.40 résume les observations faites sur l'étalement et la motilité des cellules DH1, phg2Δ, et phg2Δ complémentées :

	DH1	**phg2Δ**	**phg2Δ + GFP-Phg2ΔNter**	**phg2Δ + GFP-Phg2ΔRBD**	**phg2Δ + GFP-Phg2Δkinase**	**phg2Δ + GFP-PHG2**
Motilité (flux) Vitesse	++	-	+	+	++	+
Motilité (flux) Directionalité	++	-	-	++	++	++
Etalement Surface	++	++	++	+	+	++
Etalement Polarisation cellulaire	++	-	-	-	++	+
Etalement Protrusions allongées	++	-	-	++	-	++

Fig 3.40 : *Résumé des résultats obtenus sur les cellules DH1, phg2Δ, et phg2Δ complémentées. « ++ » indique un comportement normal pour ce paramètre, « - » indique un défaut, et « + » indique un défaut partiellement complémenté.*

Le domaine kinase de Phg2 semble influencer la forme des protrusions, mais pas leur localisation. Les cellules exprimant Phg2 privée de ce domaine n'ayant pas de problème de motilité, on en conclut que ce défaut de forme des protrusions ne peut expliquer les problèmes de motilité des cellules phg2Δ. Pour les autres complémentations, les cellules font des protrusions dans toutes les directions et ont du mal à se polariser. Or ces cellules complémentées sont moins motiles que les cellules sauvages DH1, même si elles le sont plus que les cellules phg2Δ.

Le défaut essentiel des cellules phg2Δ concernant la motilité cellulaire est donc probablement un défaut de polarisation des cellules, lié au fait que les cellules émettent des protrusions dans toutes les directions ou au fait qu'aucune protrusion ne semble être assez stable dans le temps pour permettre la polarisation cellulaire.

Pour quantifier ces observations, nous avons déterminé la portion du contour de la cellule occupée par des protrusions à chaque instant t pour des cellules DH1 et phg2Δ. Les données obtenues sont représentées sur la figure 3.41 sous forme d'histogrammes. L'étalement étant souvent isotrope lors des toutes premières secondes, même pour des cellules DH1 ou AX2 comme on l'a vu, et les cellules phg2Δ étant souvent peu actives à la fin de l'étalement, nous n'avons étudié que les données correspondant à des temps compris entre 20s et 150s après le début de l'étalement.

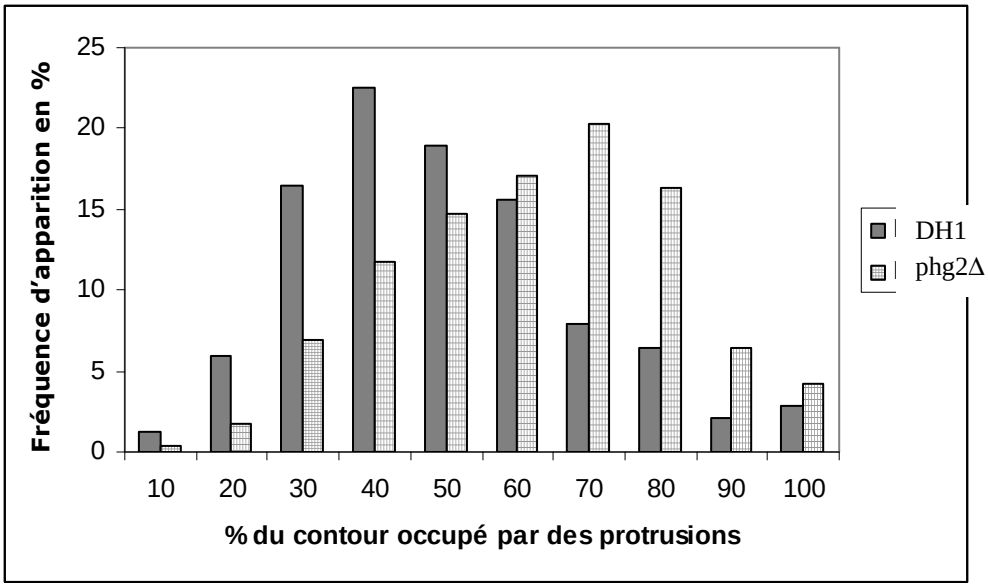


Fig 3.41 : Histogramme du pourcentage du contour des cellules occupé par des protrusions lors de l'étalement pour des cellules DH1 et phg2Δ . La figure regroupe les valeurs obtenues à différents t entre 20s et 150s après le début de l'étalement, pour 25 cellules de chaque souche.

Cet histogramme confirme les observations faites sur les films. Les cellules phg2Δ présentent typiquement des protrusions sur 60 à 80 % de leur contour, alors que les cellules DH1 ne font des protrusions que sur 30 à 50 % de leur contour. Ce manque de localisation des protrusions, empêche la cellule de se polariser et pourrait expliquer les problèmes de motilité de ces cellules.

Polarisation des cellules phg2Δ

Pour comparer la capacité des cellules DH1 et phg2Δ à se polariser, nous avons exprimé dans ces deux souches deux fragments de protéines en fusion avec la GFP :

- le domaine PH de la protéine CRAC. Ce domaine se lie au PI(3,4,5)P_3 produit par les PI3-kinases, dont nous avons déjà vu le rôle dans la polarisation cellulaire. Lorsqu'une cellule exprimant le domaine PH de CRAC en fusion avec la GFP se polarise, on doit observer une fluorescence localisée au front avant de la cellule.
- La protéine LimE privée de son domaine coiled-coil. Cette protéine se lie aux filaments d'actine nouvellement créés, et marque donc le front avant des cellules. Une cellule bien polarisée doit avoir un front $LimE_{\Delta CC}$-GFP bien marqué et stable à l'avant de la cellule.

Nous avons observé la fluorescence de ces cellules lors de l'étalement (figure 3.42).

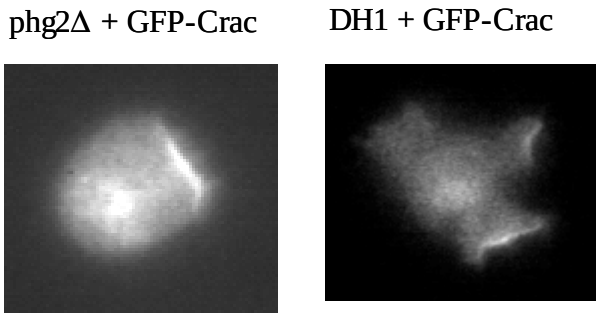


Fig 3.42 : Fluorescence de cellules DH1 et phg2Δ exprimant la protéine GFP-Crac. Dans les deux cas des fronts apparaissent sur le bord de la cellule au moment où elle entre en contact avec le substrat.

Dans les cellules phg2Δ on observe des fronts de GFP-CRAC, ce qui signifie que la voie de signalisation impliquant les PI3-kinases fonctionne toujours dans ces cellules. Nous avons également remarqué que sur la plupart des cellules, on pouvait observer un front de GFP-CRAC au moment où la cellule entre en contact avec le substrat. C'est le cas pour environ 85% des cellules DH1 et des cellules phg2Δ. On peut supposer que le contact avec le substrat déclenche une signalisation passant par le PIP_3 et impliquée dans l'étalement.
Après cette phase de contact, des fronts GFP-CRAC peuvent toujours apparaître, mais ils sont moins fréquents. Il se crée environ 0,11 fronts par minute et par cellule pour DH1 et 0,19 pour phg2Δ. Ces fronts ont une durée de vie très variable, typiquement de l'ordre de 30s.
Donc les cellules phg2Δ ont la capacité de se polariser spontanément en faisant apparaître un gradient de PIP_3. D'autre part, le développement des cellules phg2Δ est normal, même si l'agrégation démarre plus tôt que dans la souche sauvage (Cherix et al., 2006). Cela signifie que ces cellules sont capables de faire du chimiotactisme, et confirme l'absence de phénotype au niveau de la régulation du PIP_3 par le couple PI3-kinases/PTEN.

Pour ce qui est de $LimE_{\Delta CC}$-GFP, on observe également des fronts fluorescents avec les deux souches de cellules. Ces fronts semblent plus nombreux et plus larges chez phg2Δ que chez DH1, ce qui est en accord avec la présence de protrusions larges observées en RICM (figure 3.43). Néanmoins, nous n'avons pas quantifié ce paramètre.

Une autre différence est observée au niveau de la zone de contact avec le substrat, où, après environ 5 minutes d'adhésion, on observe le même type d'agrégats de filaments d'actine que ceux décrits par P. Cosson (voir introduction de cette partie).

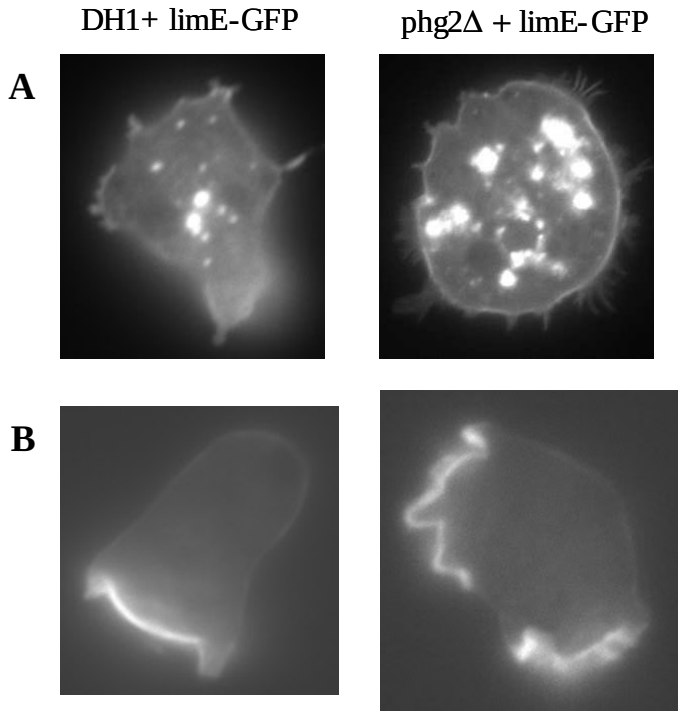


*Fig 3.43 : Fluorescence de LimEΔcc-GFP dans des cellules DH1 et phg2Δ. Focalisation : **A**: au niveau de la zone de contact avec le substrat. **B** : au milieu de la cellule. Les deux images correspondent à des cellules différentes.*

Ces agrégats apparaissant plusieurs minutes après le contact avec le substrat, ils ne sont probablement pas reliés directement au défaut d'étalement de phg2Δ. Néanmoins, il semble que la polymérisation d'actine soit mal contrôlée dans les cellules phg2Δ. L'implication de Phg2 dans le contrôle de la polymérisation de l'actine pourrait expliquer les problèmes de polarisation de ces cellules, et donc les défauts d'étalement et de motilité observés.

3.3 Etude de la fonction des protéines PKD2 et TPC de *Dictyostelium Discoideum*.

La dernière partie de ma thèse a porté sur l'étude de deux protéines, PKD2 et TPC, canaux calciques potentiels de *Dictyostelium discoideum*. J'ai dans un premier temps réalisé l'invalidation de ces gènes par recombinaison homologue. Puis j'ai étudié différents aspects du phénotype des mutants obtenus, notamment l'adhésion et la motilité cellulaire, en lien avec les données obtenues précédemment au laboratoire concernant le calcium.

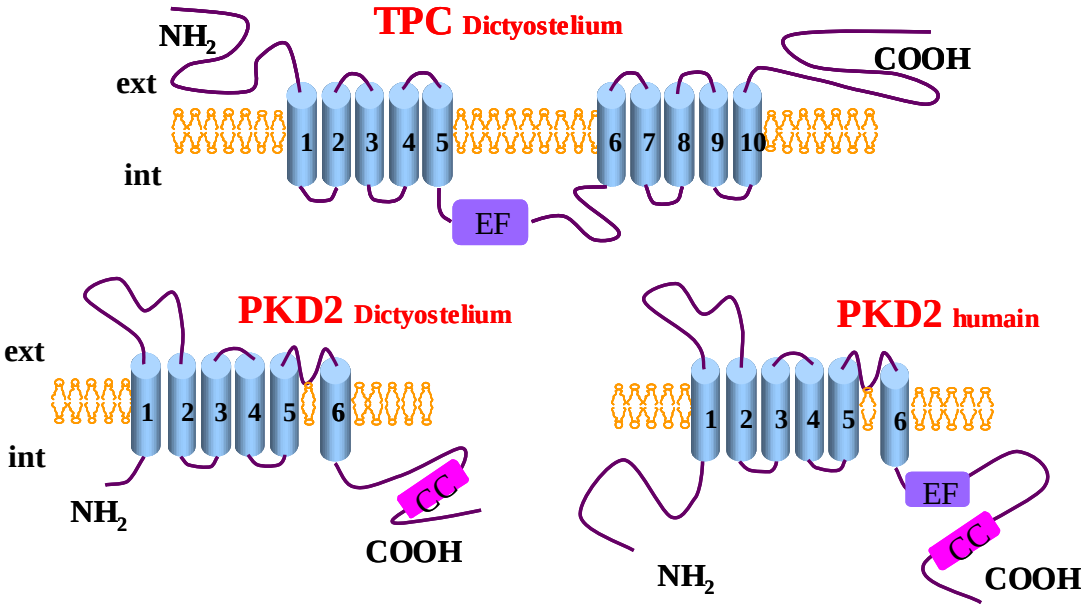


Fig 3.44 : Prédiction de structure pour PKD2 et TPC. EF = domaine EF hand, CC = domaine coiled-coil

Le gène *tpc* de *Dictyostelium* contient 6260 paires de bases, et comprend un intron. La protéine correspondante, TPC, est très longue (2060 acides aminés). La structure prédite pour cette protéine se compose de deux motifs de 5 hélices transmembranaires, reliés par un segment de 400 aa environ (figure 3.44). Ce segment contient également un motif EF hand (motif de liaison au calcium). Les domaines N-terminal et C-terminal sont assez long (respectivement 530 et 680 aa environ) et exposés à l'extérieur de la cellule. Les deux motifs transmembranaires ont de fortes homologies avec ceux des autres membres de la famille TPC, que ce soit TPC1 ou TPC2 (par exemple, 25% d'identité et 36% d'homologie pour le 1er motif de 5 hélices avec TPC2 humain).

Le gène *pkd2* de *Dictyostelium* contient 2717 paires de bases et 7 introns. La protéine correspondante, PKD2, est longue de 698 acides aminés, contre 968 pour son homologue humaine (que l'on notera $PKD2_{hum}$ par la suite). Les deux protéines possèdent les 6 hélices transmembranaires et la boucle correspondant au pore entre la cinquième et la sixième hélice qui caractérisent les canaux TRP, et partagent 16% d'identité et 31% d'homologie. Les domaines transmembranaires sont particulièrement conservés (26% d'identité et 38% d'homologie) et on peut donc penser que la fonction de canal calcique de $PKD2_{hum}$ sera présente chez PKD2. Les principales différences entre PKD2 et $PKD2_{hum}$ se situent aux extrémités N-terminale et C-terminale. PKD2 possède 180 acides aminés de moins que $PKD2_{hum}$ à l'extrémité N-terminale, et 70 de moins à l'extrémité C-terminale. De plus, en C-terminal, alors que $PKD2_{hum}$ possède un domaine coiled-coil, qui lui sert notamment à interagir avec PKD1, et un motif EF hand, PKD2 ne semble posséder qu'un domaine coiled-coil.

3.3.1 Invalidation de pkd2 et tpc et surexpression de GFP-PKD2

Les mutants nuls ont été préparés par recombinaison homologue suivant le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

L'inactivation effective des gènes étudiés a été vérifiée par PCR, en utilisant des amorces localisées aux extrémités de la cassette de résistance à la blasticidine introduite dans les constructions d'invalidation.

Les résultats obtenus par PCR sont présentés sur les figures 3.45 et 3.46 pour *tpc* et *pkd2*. Pour *tpc*, on voit que le fragment amplifié avec les primers Pd et Ph passe d'une longueur de 750 paires de bases (pb) dans la souche sauvage à 2000 pb, ce qui signifie qu'un fragment d'ADN s'est bien inséré dans le génome entre Pd et Ph. Le fait que le fragment inséré corresponde bien à la cassette BsR est confirmé par les résultats obtenus dans les autres colonnes du gel, où on voit que les couples de primers Pd-OL3 et Ph-OL1 permettent d'amplifier des fragments d'environ 300 et 500 paires de bases respectivement chez le mutant, alors que rien n'est amplifié dans la souche parentale. Ceci prouve que la cassette de résistance a bien été insérée dans le gène *tpc*, puisque les deux extrémités de la cassette BsR sont présentes. Le gène tpc a donc bien été invalidé.

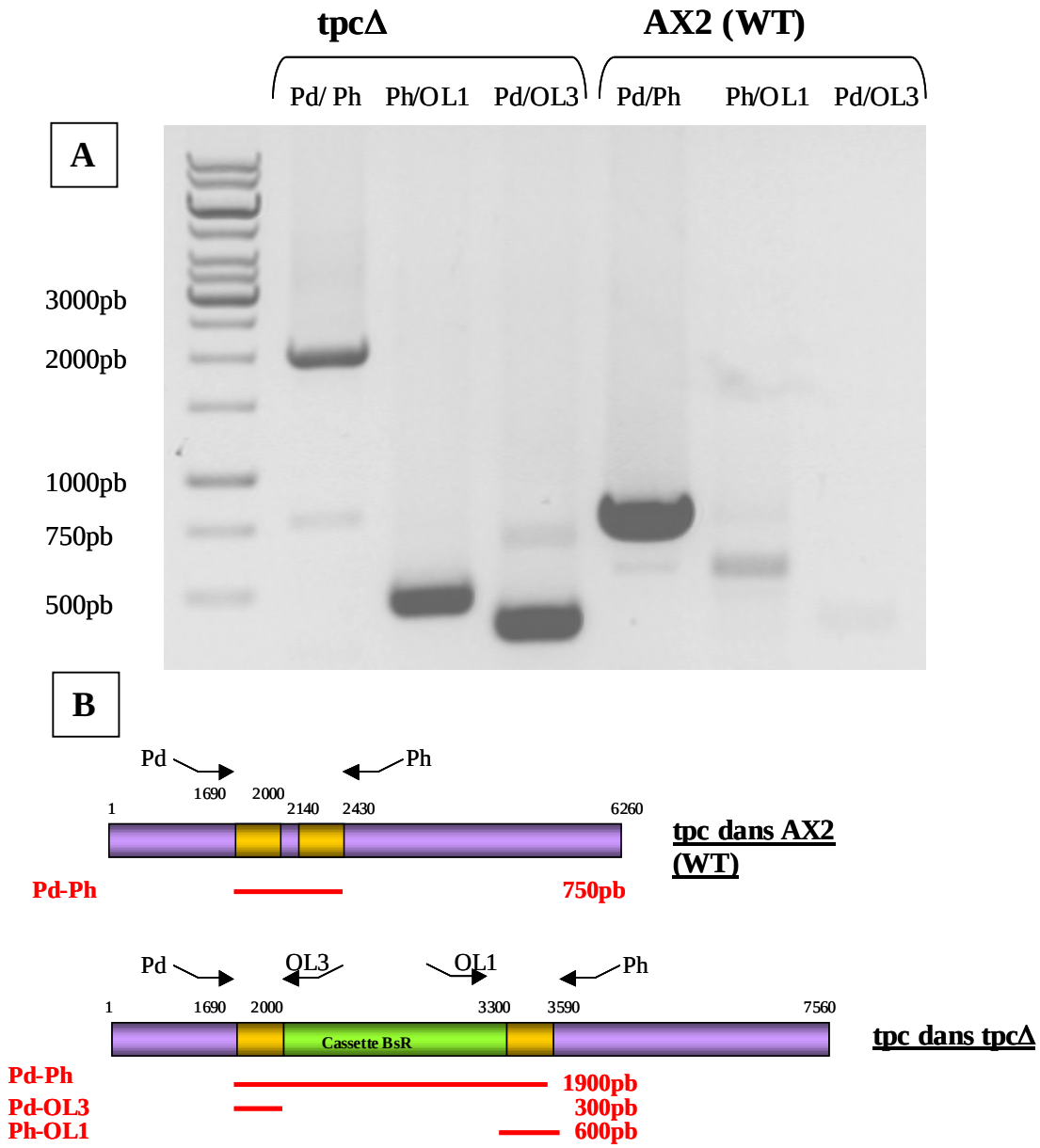


*Fig 3.45 : **A** Analyse par PCR du génome de tpcΔ et AX2. Les primers utilisés sont indiqués en haut de chaque colonne. **B** Schéma donnant pour chaque couple de primers la longueur des fragments attendus chez le parent et chez le mutant. Le primer OL3 se trouve au bord de la cassette BsR mais OL1 se trouve 300pb en retrait de l'extrémité de la cassette. Les sections jaunes correspondent aux fragments amplifiés par PCR pour préparer la construction d'invalidation (voir Matériels et Méthodes)*

Le raisonnement est le même pour *pkd2* : en utilisant les couples de primers P1-OL1 et P2-OL3, on amplifie des fragments à partir de l'ADN génomique du mutant mais pas à partir de l'ADN génomique de la souche parentale (colonne 1 et 2). Donc le gène a bien été interrompu par l'insertion de la cassette BsR. Néanmoins, on peut remarquer aussi que les fragments

obtenus avec les couples de primers P2-OL3 et P1-P2 sont plus long que ce que l'on attendait (voir figure 3.46 B) : on obtient un fragment d'environ 2000 pb entre P2 et OL3, au lieu d'un fragment de 750 pb, et on obtient un fragment d'environ 3500pb entre P1 et P2 au lieu de 2400pb. Nous avons fait séquencer ces fragments de PCR pour connaître exactement la construction obtenue.

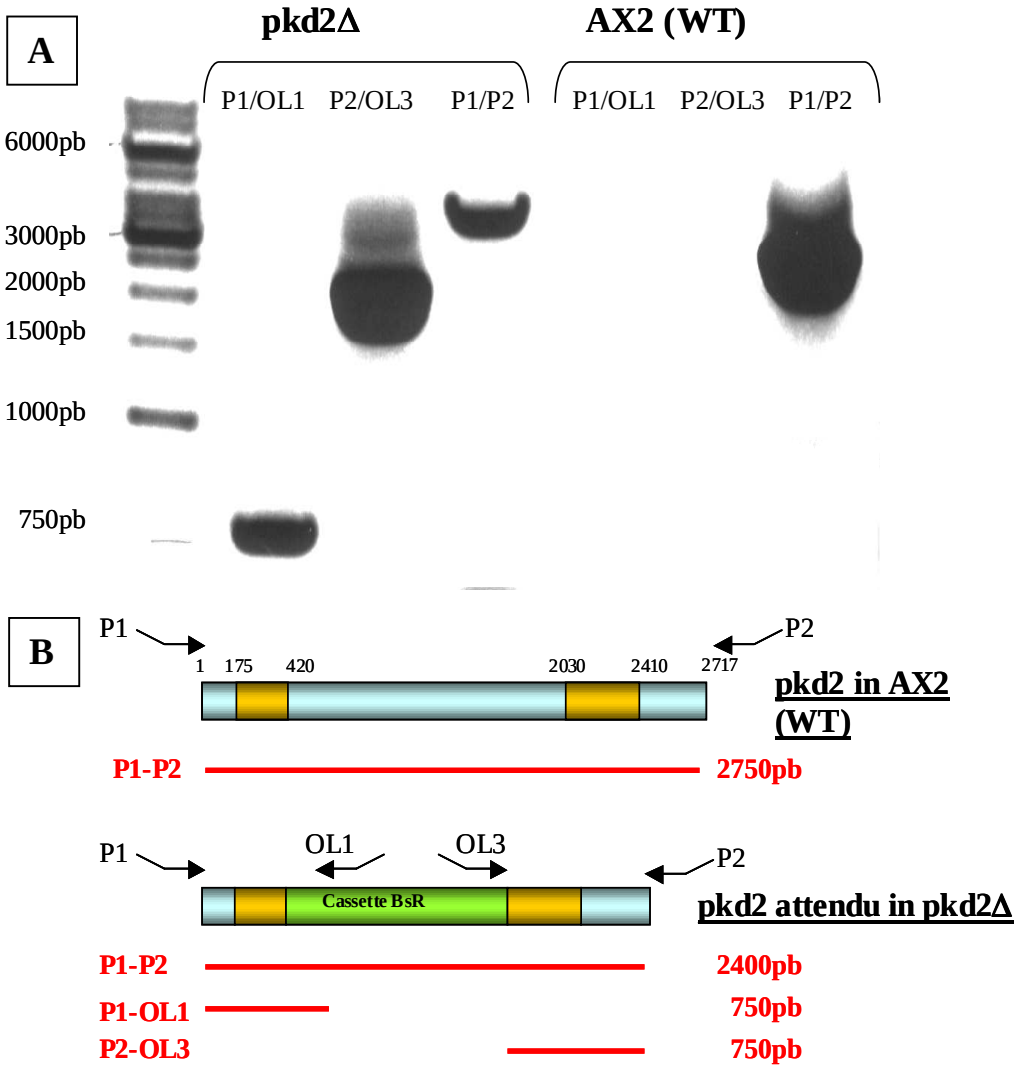


*Fig 3.46 : **A** Analyse par PCR du génome de pkd2Δ et AX2. Les couples de primers utilisés sont indiqués en haut de chaque colonne. **B** Schéma donnant pour chaque couple de primers la longueur des fragments attendus chez le parent et chez le mutant. Le primer OL3 se trouve au bord de la cassette BsR mais OL1 se trouve 300pb en retrait de l'extrémité de la cassette.*

D'après les résultats du séquençage, la recombinaison homologue s'est faite suivant le schéma de la figure 3.47 : en amont, la recombinaison s'est faite comme prévu, mais en aval la

cassette s'est insérée seulement 200pb après la fin du premier fragment utilisé pour la recombinaison. Bien que la construction obtenue ne corresponde pas à ce qui était attendu, le gène *pkd2* a bien été interrompu par la cassette BsR. De plus, 200 paires de bases appartenant à un exon ont été éliminées lors de la recombinaison. Le gène pkd2 est donc bien invalidé.

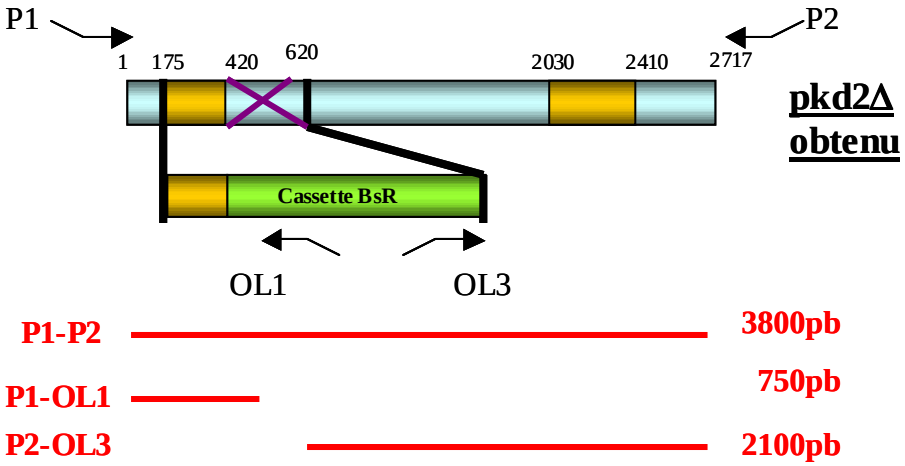


Fig 3.47 : Construction obtenue pour le gène pkd2 de la souche pkd2Δ, et longueur des fragments amplifiés par PCR correspondants.

Une fois ce mutant d'invalidation obtenu, nous avons construit par PCR un plasmide permettant la surexpression de la protéine PKD2 complète en fusion avec la GFP. Nous avons introduit ce plasmide dans des cellules pkd2Δ et dans des cellules AX2 sauvages, pour étudier l'effet possible d'une complémentation des cellules pkd2Δ et d'une surexpression de PKD2.

3.3.2 Rôle de PKD2 et TPC dans la croissance cellulaire et le développement.

Pour savoir si l'invalidation des gènes a modifié de manière importante les fonctions essentielles des cellules *Dictyostelium*, nous avons commencé par suivre la croissance des cellules en milieu HL5 (figure 3.48).

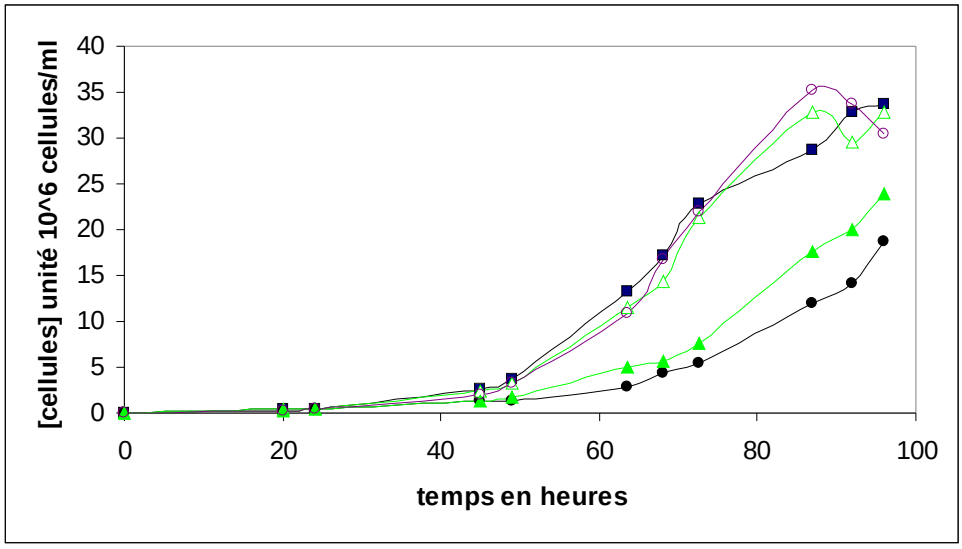


Fig 3.48 : Courbes de croissance des cellules AX2 (—■—), AX2 + GFP-PKD2 (—●—), pkd2Δ(—△—), tpcΔ(—○—), et pkd2Δ + GFP-PKD2(—▲—).

La croissance des cellules pkd2Δ et tpcΔ est normale, avec un temps de doublement de respectivement 9,2 et 9,0 heures, contre 8,9 heures pour AX2. En revanche, les cellules exprimant PKD2 en fusion avec la GFP ont un retard de croissance. Les temps de doublement sont respectivement de 11,4 et 12,4 heures pour les cellules pkd2Δ + GFP-PKD2 et AX2 + GFP-PKD2. Ce retard est bien lié à l'expression de PKD2 puisque d'autres expériences réalisées au laboratoire ont montré que des cellules exprimant la GFP seule intégrée dans le même plasmide n'ont pas de retard de croissance. Quelles que soient les souches, la taille moyenne des cellules n'est pas modifiée. Elle reste comprise entre 9 et 10 µm de diamètre. Les cellules privées de PKD2 ou de TPC n'ont donc pas de défaut de croissance ni de division.

Lorsqu'elles se retrouvent privées de nutriments, les cellules *Dictyostelium discoideum* déclenchent un processus de développement aboutissant à la formation de spores, pouvant survivre plusieurs jours en attendant de retrouver des conditions favorables pour se multiplier. Ce processus est un bon indicateur de défaut de chimiotactisme, de signalisation et d'adhésion, notamment entre cellules (formation du limaçon et des fructifications).

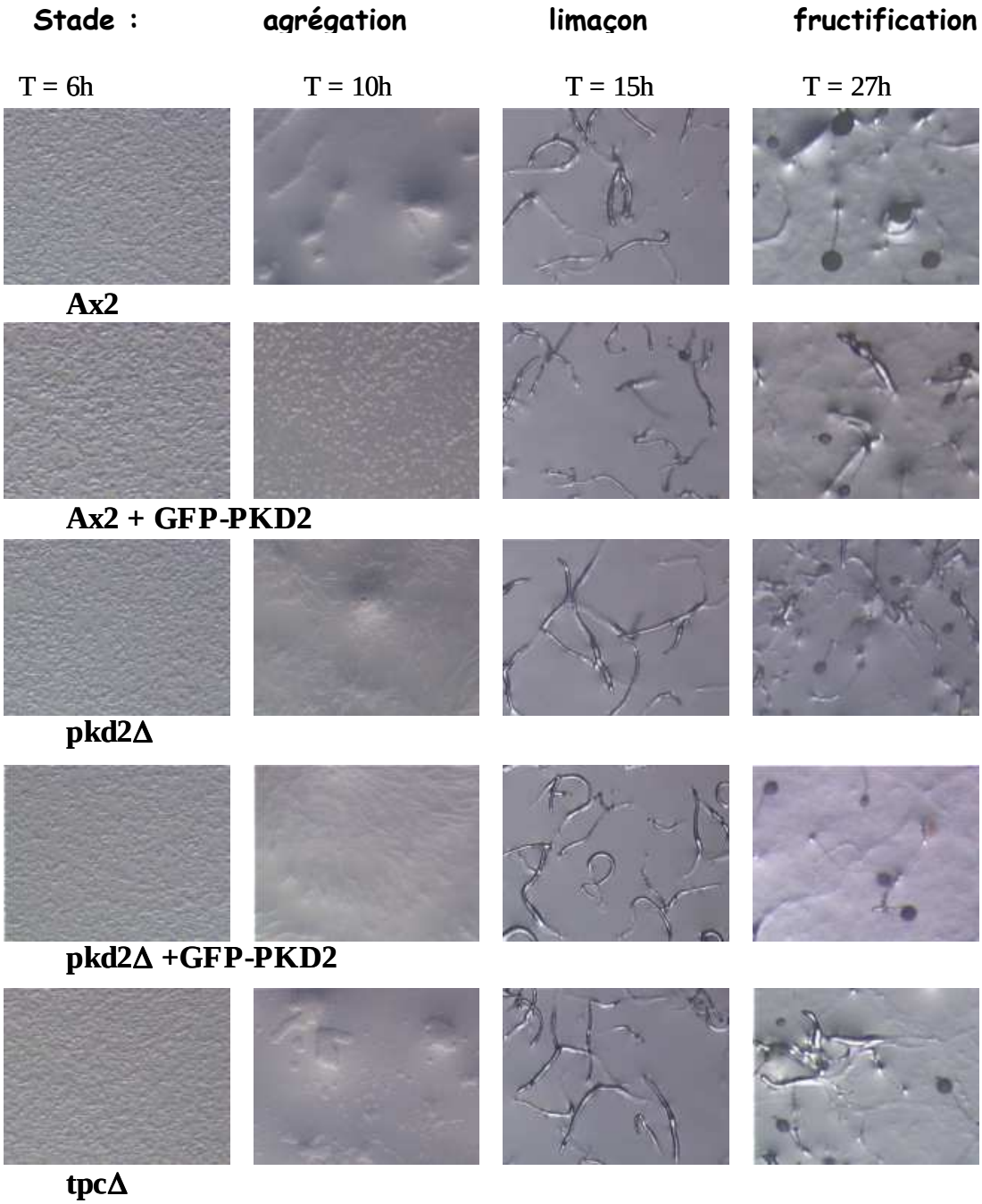


Fig 3.49 : Développement de cellules AX2, pkd2Δ, pkd2Δ + GFP-PKD2, AX2 + GFP-PKD2, tpcΔ sur un milieu solide H5-agar.

Nous avons donc étudié le développement de ces différentes souches pour voir si elles présentaient un défaut de ce type. Pour cela nous avons centrifugé 10^8 cellules, que nous avons reprises en tampon H5 (5mM Hepes, 5mM KCl, pH 7) et déposées sur une boite de petri contenant un milieu solide H5 – agar (1,5%). On laisse ensuite les cellules adhérer

pendant 10mn puis on aspire le liquide restant. A partir de cet instant le développement prend environ 24h, et on enregistre régulièrement des images à l'aide d'une loupe binoculaire.
Toutes les souches étudiées parviennent au bout du développement (figure 3.49). Les protéines étudiées ne jouent donc pas un rôle essentiel dans le processus de développement de *Dictyostelium discoideum.* En particulier, la première étape du processus (entre 6 et 12 heures environ) consistant en une agrégation des cellules par chimiotactisme en réponse à un gradient d'AMPc, on peut conclure que les protéines étudiées ne sont pas indispensables pour le chimiotactisme de *Dictyostelium*. On peut tout de même noter que les cellules surexprimant GFP-PKD2 ont un léger retard au niveau de l'agrégation (voir à T= 10h sur la figure 3.49).
Le tampon utilisé pour le développement ne contenant pas de calcium, nous avons refait ces expériences de développement en ajoutant soit 10mM d'EGTA, soit 10mM de $CaCl_2$ pour voir si le changement de concentration de calcium pouvait induire des différences de phénotype entre les souches étudiées.
L'ajout de calcium ne modifie pas le phénotype observé, les souches exprimant GFP-PKD2 ont toujours un retard d'une à deux heures au moment de la formation des limaçons (T=15h). D'autre part, dans toutes les souches, cette formation se fait avec environ deux heures de retard par rapport aux conditions sans calcium.
L'ajout d'EGTA perturbe le développement de toutes les souches de manière similaire après la phase d'agrégation. Un pseudo-limaçon se forme, mais les cellules à l'intérieur du limaçon sont très peu adhérentes les unes aux autres, et la structure se désagrège petit à petit sans atteindre le stade final de fructification.
Ces observations sont cohérentes avec le fait que l'adhésion cellule-cellule est dépendante du calcium extracellulaire et joue un rôle important dans la formation des fructifications. Les protéines PKD2 et TPC ne semblent pas jouer un rôle durant le développement.

3.3.3 Analyse de la motilité cellulaire sous contrainte hydrodynamique

Nous sommes ensuite passés à l'étude du phénotype nous intéressant le plus, à savoir la motilité des cellules stimulées par un flux hydrodynamique. Nous voulions notamment savoir si la réponse des cellules à l'augmentation de la concentration en calcium était modifiée chez les cellules mutantes ou chez les cellules complémentées (figure 3.50).

Les cellules dépourvues de PKD2 ou de TPC sont toujours capables de se déplacer, et atteignent une vitesse équivalente à celle de AX2. Par exemple, en tampon SB + 300µM $CaCl_2$, les cellules tpcΔ comme les cellules AX2 ont une vitesse de 20,5µm/min, contre 22,5µm/min pour pkd2Δ. De plus, les cellules sont toujours capables de sentir la concentration de calcium extracellulaire et de répondre à cette concentration, puisque la vitesse des cellules augmente lorsque l'on augmente la concentration de calcium extracellulaire, et se stabilise à une valeur maximale à partir de 300µM de $CaCl_2$ environ, tout comme AX2. PKD2 et TPC ne sont donc pas essentielles pour l'augmentation de la motilité en réponse au calcium extracellulaire.

En revanche, la vitesse des cellules pkd2Δ surexprimant la protéine totale parait significativement inférieure aux vitesses de la souche sauvage, même si cette vitesse augmente également avec la concentration de calcium extracellulaire. Cette moindre vitesse ne semble pas résulter d'un décalage dans la courbe vitesse moyenne en fonction de [$CaCl_2$], puisque au-delà d'1mM de calcium la vitesse se stabilise autour de 15µm/min environ.

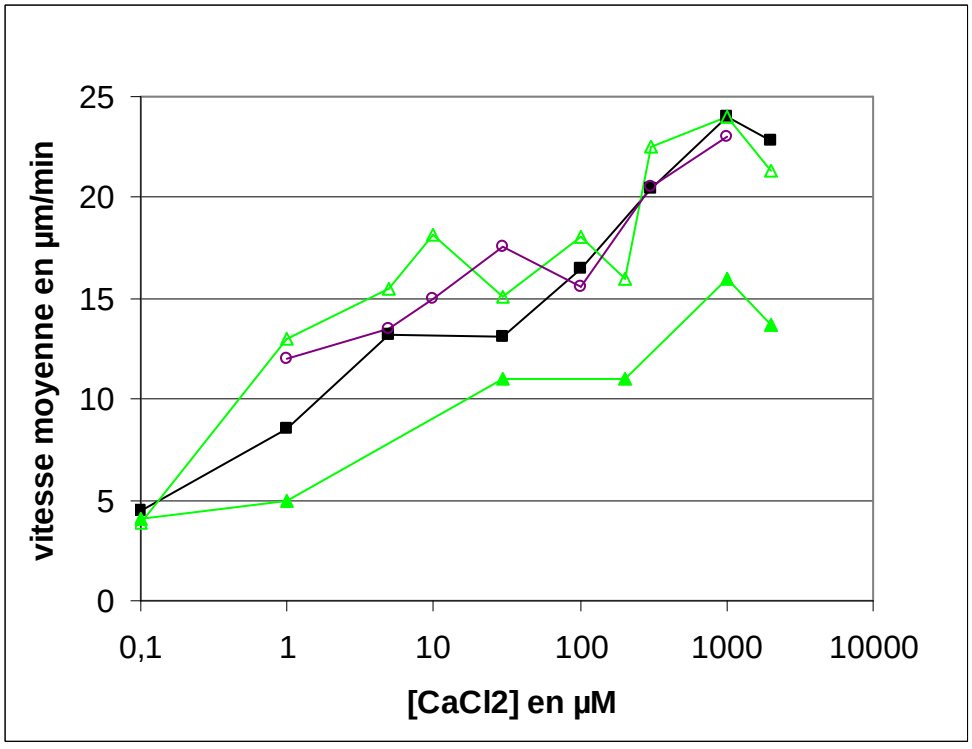


Fig 3.50 : Vitesse moyenne sous flux de cellules AX2 ( ), pkd2Δ ( ), tpcΔ ( ) et pkd2Δ + GFP-PKD2 ( ) en fonction de la concentration en calcium extracellulaire.

Lors de ces expériences, il nous a semblé que les cellules pkd2Δ adhéraient moins bien sur la surface que les cellules AX2. Pour le tester quantitativement, nous avons mesuré et comparé les contraintes de détachement $\sigma_{50\%}$ de ces cellules (figure 3.51).

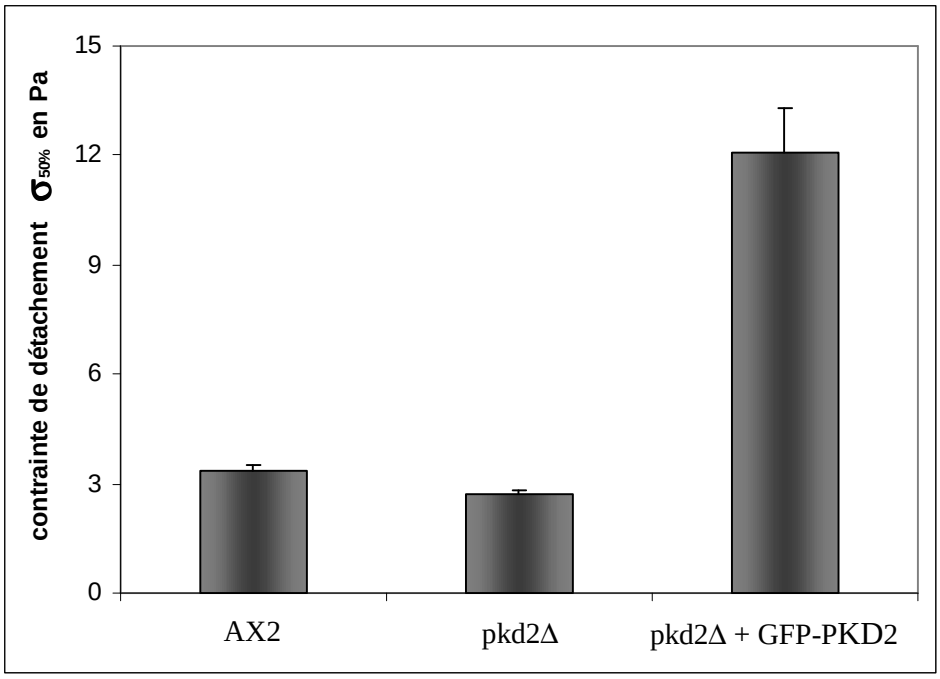


Fig 3.51: Contraintes de détachement relatives des cellules AX2, pkd2Δ et pkd2Δ + GFP-PKD2 en tampon SB.

Les cellules pkd2Δ sont environ 20% moins adhérentes que les cellules AX2 en tampon SB. Cette différence est assez faible et on peut penser que l'absence de PKD2 n'a qu'un effet mineur sur l'adhésion cellulaire. Nous n'avons pas testé l'adhésion en milieu HL5, car contrairement à phg2Δ ces cellules adhèrent bien au fond des boites de culture. Il n'y a donc pas de raison de penser qu'elles présentent un défaut important de ce côté.
Nous avons également mesuré la contrainte de détachement des cellules pkd2Δ surexprimant la protéine totale. Ces cellules se sont avérées environ trois fois plus adhérentes que les cellules sauvages.

En résumé, les cellules n'exprimant pas PKD2 ou TPC ne semblent avoir aucun défaut important, que ce soit au niveau de la croissance et de la division cellulaire, du chimiotactisme ou de la motilité cellulaire. La surexpression de la protéine PKD2 en revanche provoque une augmentation de l'adhérence et une diminution de la motilité. La question se pose bien

évidemment de savoir si ces défauts sont liés à la surexpression elle-même, qui perturberait tous les mécanismes de la cellule de manière non spécifique, ou à l'action plus spécifique de PKD2.

Localisation de la protéine GFP-PKD2

Enfin, nous avons observé la localisation de la protéine GFP-PKD2 en suivant la fluorescence de la GFP (figure 3.52).

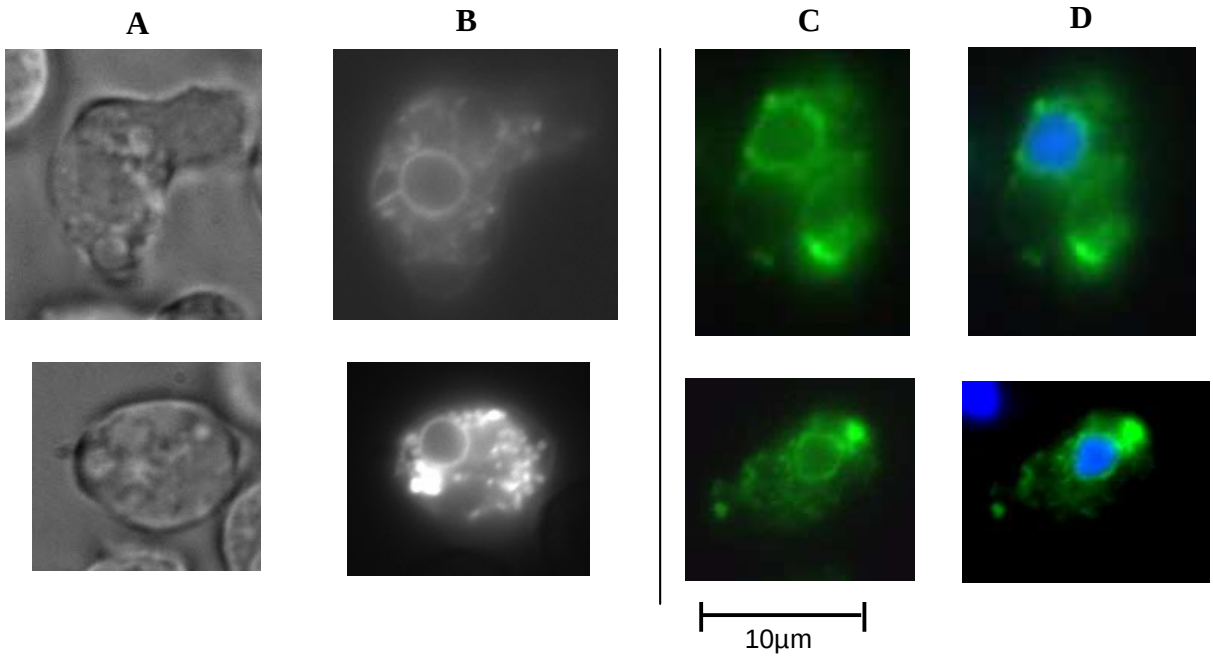


Fig 3.52 : Images de cellules pkd2Δ exprimant GFP-PKD2. A gauche, deux cellules en contraste de phase (colonne A) et fluorescence (GFP, colonne B). A droite, deux autres cellules en fluorescence (GFP en vert, colonne C) et superposition de deux fluorescences (GFP, vert, et marquage du noyau au DAPI, bleu, colonne D).

La fluorescence, et donc la protéine, n'est pas répartie de manière homogène dans la cellule. Elle est localisée principalement sous forme d'un anneau autour du noyau comme l'indique les images obtenues avec un marquage au DAPI (qui marque le noyau des cellules). De petits points fluorescents, très mobiles, semblent se déplacer de la membrane plasmique vers l'anneau. Sur certaines images, on observe également des taches plus importantes (voir figure 3.52, C et D par exemple). Cela pourrait évoquer une localisation de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique, et non au niveau de la membrane plasmique comme espéré pour jouer un rôle de mécano-senseur.

Il faudrait être sur que cette localisation correspond bien à la localisation de la protéine endogène, et non à un problème de surexepression ou à un défaut de synthèse de la protéine

GFP-PKD2. Je n'ai pas réussi à vérifier l’intégrité de la protéine en réalisant un western blot à l’aide d’anticorps anti-GFP. La vérification reste donc à établir, tout comme la fonction exacte de cette protéine dans la cellule.

4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les principales caractéristiques de l'étalement cellulaire de *Dictyostelium discoideum* :

L'étalement de cellules Dictyostelium comporte deux étapes principales : dans une première phase, l'aire de contact avec le substrat croît de manière linéaire avec le temps. Dans un second temps, la courbe s'arrondit et aboutit à un plateau qui correspond à l'aire d'étalement maximale de la cellule. L'aire de contact de la cellule varie ensuite autour de cette valeur de seulement 10 à 15%.
Autre caractéristique importante, l'étalement n'est pas isotrope, mais présente une ou deux directions privilégiées. En conséquence, la cellule se polarise rapidement, et des zones de gains (protrusions) et de pertes (rétractions) d'aire bien définies apparaissent. L'intensité des gains ou pertes d'aire au cours de l'étalement varie en fonction du temps de manière périodique, avec une période d'environ 7s.
Enfin, le calcium augmente la surface des protrusions, sans modifier leur fréquence, et l'adhésivité du substrat diminue la vitesse des rétractions.
Ces études menées sur l'étalement en général nous ont permis d'approcher la fonction de la protéine Phg2, qui intervient dans la polarisation cellulaire, notamment au niveau de la définition des zones de protrusions.

Nous allons revenir sur ces principaux résultats, en commençant par comparer les caractéristiques observées lors de l'étalement de cellules *Dictyostelium discoideum* à d'autres types cellulaires.

4.1 Caractères généraux de l'étalement cellulaire.

Outre les travaux que j'ai réalisés sur *Dictyostelium*, des études de l'étalement cellulaire ont été faites récemment sur des fibroblastes ((Dunn and Zicha, 1995), (Dobereiner et al., 2004)), sur des cellules endothéliales (Reinhart-King et al., 2005), sur des monocytes humains (Pierres et al., 2003) et sur des neutrophiles (Sengupta et al., 2006). Dans tous ces cas, comme on peut s'y attendre, l'étalement des cellules présente une phase de croissance suivie d'une phase de stabilisation de l'aire autour d'une aire maximale.
Pour comparer ces étalements à ceux de *Dictyostelium*, les cinétiques caractéristiques obtenues, représentant l'aire A en fonction du temps t ont été regroupées sur la figure 4.1 .

Suivant les articles, les cinétiques d'étalement sont représentées soit directement avec l'aire en fonction du temps, soit en exprimant le logarithme de l'aire en fonction du logarithme du temps, pour mettre en évidence une évolution des données suivant des lois de puissance (A proportionnel à t^{α}). Pour *Dictyostelium*, nous avons utilisé la courbe moyenne d'étalement de cellules AX2 sur du verre en présence de 500µM $CaCl_2$, représentée suivant les deux échelles existant dans les articles étudiés. Les protocoles expérimentaux utilisés varient légèrement. En dehors de nos travaux, les surfaces utilisées sont recouvertes de fibronectine, à des concentrations variables dans le cas des cellules endothéliales bovines. Les aires mesurées correspondent soit aux aires de contact observées par RICM (*Dictyostelium*, monocytes, neutrophiles, figure 4.1 A, C, D, E), ou par TIRF (total internal reflexion fluorescence) (fibroblaste, figure 4.1 F), soit au contour cellulaire, observé en microscopie classique (cellules endothéliales, figure 4.1 B).

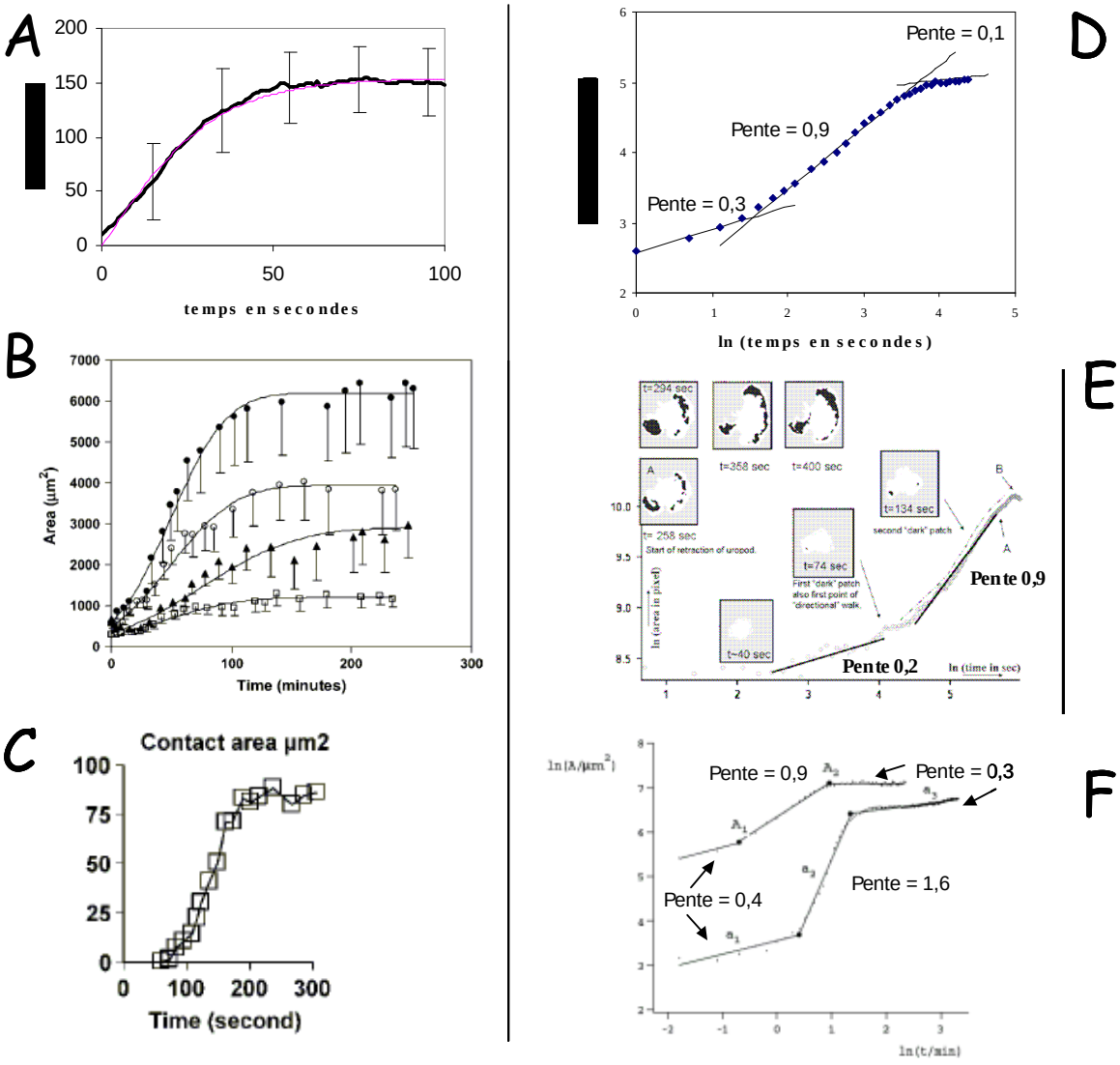


Fig 4.1: *Courbes d'étalement (aire de contact en fonction du temps) de différents types de cellules :* ***A et D*** *: Dictyostelium discoideum, courbes moyennes de cellules AX2 sur verre en tampon SB + 500µM $CaCl_2$. Courbes ajustées respectivement par des fonctions tanh et puissances* ***B*** *: cellules endothéliales bovines, courbes moyennes à différentes concentrations de ligand présents sur la surface (fragment RGD de la fibronectine) (Reinhart-King et al., 2005). L'aire totale atteinte augmente avec la concentration en ligand. Courbes ajustées par une fonction erreur.* ***C*** *:Monocytes humains, exemple de courbe d'étalement. (Pierres et al., 2003)* ***E*** *:Neutrophiles humains, exemple de courbe d'étalement (Sengupta et al., 2006)* ***F*** *: Fibroblastes d'embryon de souris, deux exemples de courbes d'étalement, représentatifs de deux populations de cellules s'étalant à des vitesses différentes (Dobereiner et al., 2004). Sur les courbes A, B et C, l'aire A est représentée en fonction du temps t. Sur les courbes D,E et F, ln(A) est représenté en fonction de ln(t).*

4.1.1 L'étalement est un processus quasi-linéaire.

Les paramètres des cinétiques d'étalement sont très variables. En particulier, les temps mis pour s'étaler varient d'une à deux minutes pour *Dictyostelium*, à plusieurs heures pour les cellules endothéliales ou les fibroblastes. Les neutrophiles s'étalent en 5 minutes environ suite à leur activation par le fMLF, et les monocytes en 3 à 4 minutes, des durées proches de celle de *Dictyostelium*. De plus, toutes les courbes d'étalement ont été ajustées par des modèles différents (tanh pour *Dictyostelium*, fonction erreur pour les cellules endothéliales, succession de fonctions puissance pour les neutrophiles et les fibroblastes, etc).

Malgré ces différences, les courbes A, B et C de la figure 4.1 ont en commun une croissance de l'aire quasi-linéaire jusqu'à l'approche du plateau correspondant à l'aire maximale. Pour les courbes D, E et F, exprimant des données logarithmiques, on distingue trois phases, plus ou moins marquées suivant les expériences :

- Une phase de démarrage lente, où l'aire évolue en puissance 0,2 à 0,4 de t.
- Une phase de gain d'aire rapide, responsable de la majeure partie de l'aire totale atteinte par la cellule, où l'aire évolue de manière quasi linéaire (typiquement, A proportionnel à $t^{0,9}$, des valeurs supérieures sont observées pour une partie des fibroblastes, figure 4.1 F).
- Enfin, une phase où l'aire est gagnée plus lentement, avec un lien en puissance entre A et t inférieur à 0,3. Cette dernière phase correspond dans les trois cas à l'apparition des rétractions sur le contour de la cellule.

Il parait en revanche difficile de comparer l'importance relative des différentes phases puisque la durée de celles-ci varie en fonction du protocole expérimental. Ainsi, dans le cas de *Dictyostelium*, la première phase de croissance lente peut paraître très courte voire inexistante sur la figure 4.1 D. Néanmoins, nous observons pour certaines cellules un délai entre la formation du premier point de contact et l'étalement rapide de la cellule. Pour réaliser nos moyennes et coordonner nos cellules, nous avons choisi de supprimer ce temps de latence dans nos courbes. Ces éléments semblent donc être conservés entre espèces, et le mécanisme d'étalement semble être proche de cellule à cellule, au moins pour le caractère quasi-linéaire de l'aire gagnée.

Autre point commun, la nature du « moteur » de l'étalement. Les travaux de Pierres et Sengupta (sur les monocytes et les neutrophiles), grâce à l'utilisation d'inhibiteurs (latrunculine A et cytochalasine B), confirment le rôle central de la polymérisation d'actine.

L'article de Sengupta montre d'ailleurs, pour les neutrophiles, une différence d'affinité entre les actions de la latrunculine et de la cytochalasine semblable à celle observée chez *Dictyostelium*.

Enfin, la fin de l'étalement et la transition vers la motilité étant liée à l'apparition de rétractions et non à un arrêt des protrusions, la tension membranaire semble jouer un rôle essentiel dans l'étalement cellulaire.

4.1.2 Anisotropie de l'étalement et cellules phagocytaires

Les étalements de *Dictyostelium*, des monocytes et des neutrophiles partagent d'autres caractéristiques : Tous les trois sont anisotropes et les cellules se polarisent très rapidement (figure 4.2)**.**

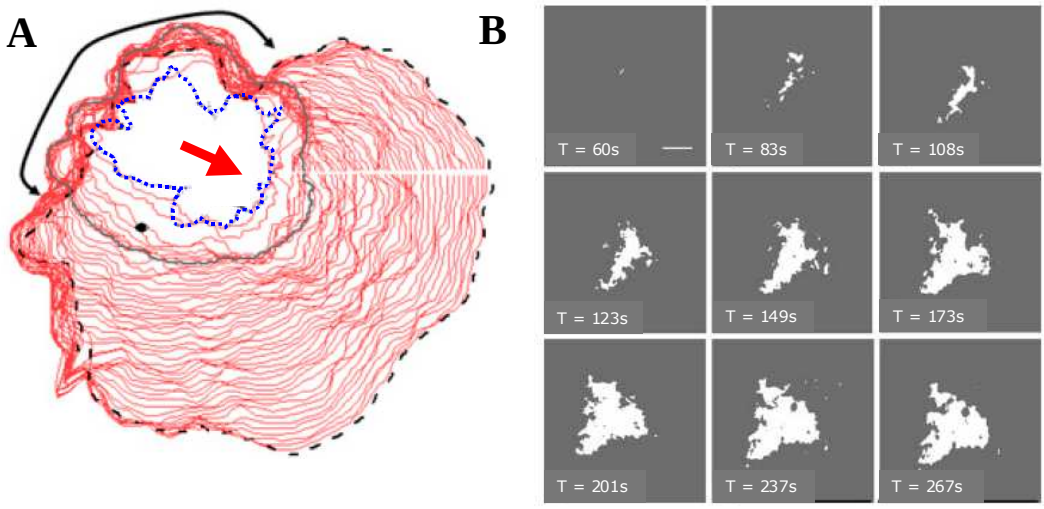


*Fig 4.2 : Etalements directionnels : **A :** Neutrophile. L'étalement est déclenché par une stimulation homogène par du fMLF (chimioattractant). Le contour initial de la cellule est indiqué en pointillés bleus. Le bord cellulaire est localisé toutes les deux secondes (traits rouges). Le trait noir délimité par deux flèches indique la portion immobile de la cellule, et la flèche rouge la direction de l'étalement (Sengupta et al., 2006). **B :** Monocyte. L'étalement est suivi en RICM puis les images sont segmentées comme dans nos travaux (Pierres et al., 2003).*

On peut remarquer que *Dictyostelium*, les neutrophiles et les monocytes sont des cellules phagocytaires. La phagocytose supposant d'être capable d'étendre rapidement sa membrane dans une direction donnée pour capturer une particule, on peut penser qu'il existe des parallèles entre les mécanismes de l'étalement et de la phagocytose. L'existence d'une signalisation liée au contact avec une surface, mise en évidence chez *Dictyostelium* par la présence de front de PIP_3 au moment du contact avec une surface confirme la ressemblance entre étalement et phagocytose. On peut également évoquer l'étalement des cellules phg2Δ. Ces cellules, dont la phagocytose est déficiente, s'étalent de manière quasi-isotrope. Le rôle de Phg2 dans la polarisation cellulaire pourrait donc être important pour le contrôle de la phagocytose.

4.2 Phénomènes oscillants, étalement et motilité

Mes travaux ont mis en évidence la présence d'oscillations quasi-périodiques au niveau des aires gagnées et perdues par la cellule lors de l'étalement. La période de ces oscillations est d'environ 6 à 8s. L'origine de ces oscillations n'est pas connue. Parmi ce que nous avons testé, il apparaît que ni la concentration en calcium, ni la nature plus ou moins adhérente du substrat ne modifie significativement la période de ces oscillations. Les cellules phg2Δ présentent également ces oscillations. Les travaux de S. Fache ont montré que de telles oscillations étaient aussi observables dans le cadre de la motilité sous flux, et que leur période ne dépendait là encore ni de la concentration en calcium, ni de la présence des protéines Gβ, du récepteur à l'IP3 ou de la myosine II. Les périodes obtenues pour ces expériences vont de 8 secondes environ pour les protrusions, à 12s environ pour les rétractions, c'est-à-dire des valeurs équivalentes ou légèrement supérieures aux valeurs que j'ai moi-même obtenu lors de l'étalement. L'influence des forces mécaniques sur ces oscillations reste à quantifier, mais ne parait pas très importante.

L'observation de ces oscillations pose la question de leur origine moléculaire, mais aussi de leur intérêt pour la cellule. Les oscillations sont observées au niveau des protrusions, même dans des conditions où les rétractions sont réduites voir inhibées (myosine II Δ, substrat plus adhérent…). D'autre part le calcium ne perturbe pas leur période non plus, alors qu'il multiplie par deux la surface des protrusions. Cela suggère que le moteur de ces oscillations est indépendant des mécanismes locaux d'émission de protrusions ou de rétractions.

L'observation d'oscillations dans le comportement cellulaire n'a rien de surprenant, et différents systèmes ont été décrits, comme le cycle circadien ou l'émission cyclique d'AMPc par les cellules *Dictyostelium*. En effet, lors de la phase d'agrégation du développement, les amibes se rassemblent en suivant une signalisation à l'AMPc. Cette signalisation est constituée d'un pic d'AMPc produit toutes les 5 minutes environ par les cellules déjà agrégées, et qui est ensuite propagé par les cellules se déplaçant vers le point d'agrégation. Les molécules impliquées dans cette signalisation périodique ont été identifiées (voir figure 4.3). La concentration d'AMPc est régulée par l'activité des protéines antagonistes ACA et REG A, qui synthétisent et hydrolysent l'AMPc. En réponse à une stimulation externe d'AMPc, CAR1 (récepteur à l'AMPc) active ACA (synthèse d'AMPc à partir d'ATP) et inhibe REG A (hydrolyse de l'AMPc) via l'activation d'ERK2. Une partie de l'AMPc produit est sécrétée et stimule à nouveau CAR1 (boucle positive). L'AMPc sécrété est également hydrolysé par la phosphodiesterase PDE. On observe donc une accumulation rapide d'AMPc et de la forme activée de ERK2, notée *ERK2.

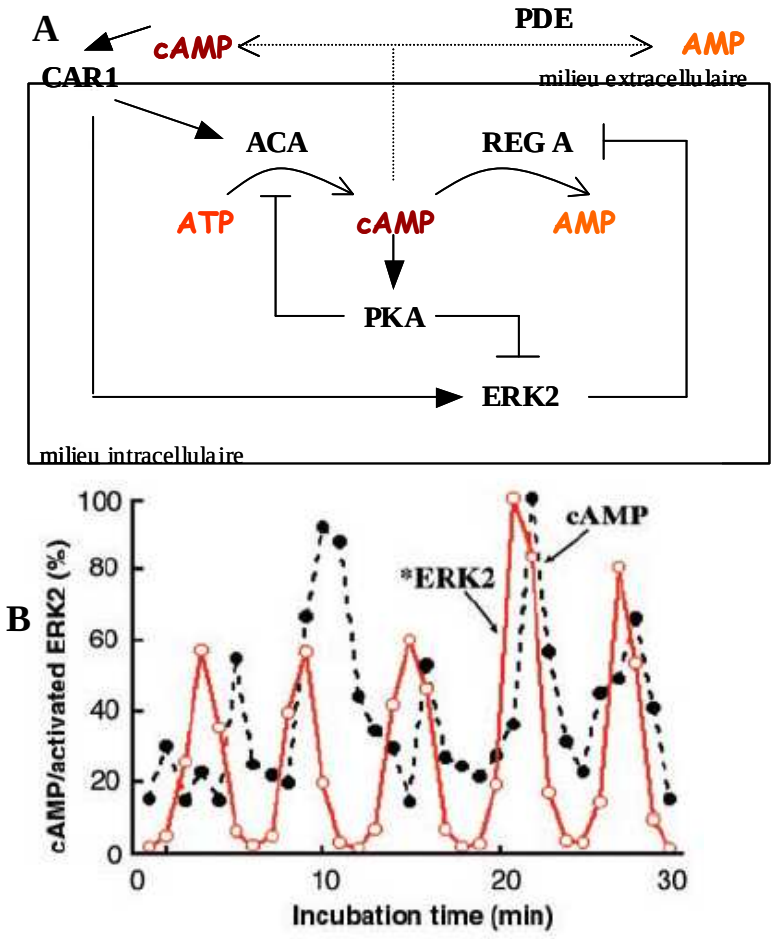


Fig 4.3 : Exemple d'un oscillateur biologique : Production de vagues régulières d'AMPc lors de l'agrégation de Dictyostelium.
***A :** Modèle de l'oscillateur : Une flèche indique une activation, une barre indique une inhibition. Les protéines impliquées sont décrites dans le texte. Les interactions entre protéines peuvent être indirectes.*
***B :** Courbe expérimentale donnant le pourcentage d'activation d'ERK2 et la concentration relative en AMPc en fonction du temps. On voit que les deux grandeurs oscillent (Maeda et al., 2004).*

L'AMPc produit active également PKA (kinase AMPc dépendante), qui phosphoryle ERK2, provoquant son inhibition. REG A est alors réactivée. De plus PKA inhibe ACA. On observe alors une diminution rapide de la concentration en AMPc. Comme le montre la figure 4.3.B, la concentration en AMPc croit puis décroît régulièrement. Il en va des même pour *ERK2, dont les pics précèdent ceux d'AMPc.
L'élément central permettant les oscillations est ici la boucle de rétroaction négative impliquant PKA et ERK2. Nous avons vu dans l'introduction que dans les voies de signalisation liées à la motilité, de nombreuses boucles de rétroaction existent. Il ne serait donc pas surprenant d'observer d'autres oscillations.

Le groupe de Uchida a montré qu'en motilité exploratrice, l'aire totale de *Dictyostelium* variait de manière périodique ((Uchida et al., 2003), figure 4.4). Les périodes où l'aire totale augmente (protrusions > rétractions) alternent avec des périodes où celle-ci diminue, selon un cycle d' environ 70 secondes. Ce cycle est nettement plus long que les périodes d'oscillations que nous avons observées. Néanmoins, à l'intérieur de chaque phase de gain ou de perte de surface, la vitesse de variation semble évoluer. De plus, dans ces expériences, les données ont été enregistrées toutes les 6 secondes, ce qui exclue l'observation de phénomènes aux périodes que nous observons (5-10s).

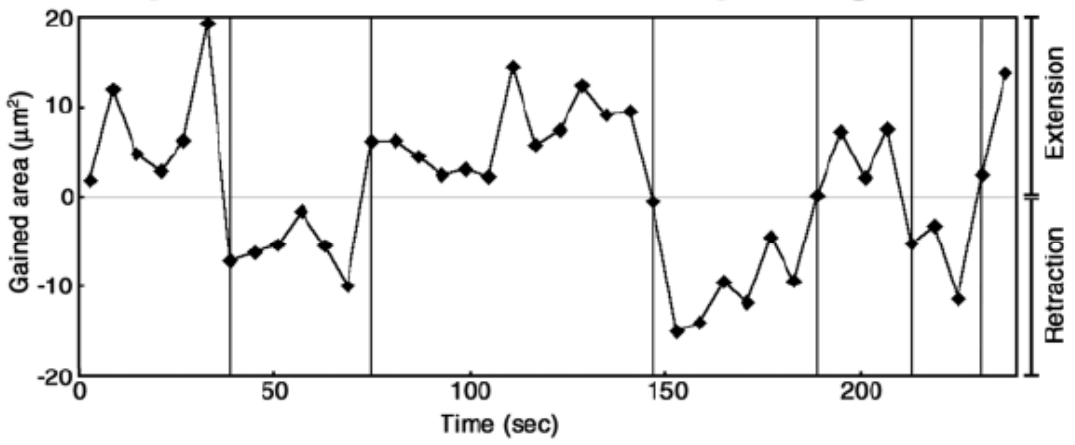


Fig 4.4 : *Fluctuation de l'aire totale de Dictyostelium en motilité exploratrice. On observe une alternance d'augmentation et de diminution de l'aire de la cellule. La période de ces variations est d'environ 70s (Uchida et al., 2003).*

D'autres travaux ont aussi montré que la motilité amibienne ne résultait pas d'un simple processus de marche aléatoire : dans le cas d'un mouvement brownien, le déplacement carré moyen varie linéairement avec t. Le déplacement carré moyen de l'amibe pathogène

Entamoebia histolytica, varie, lui, en puissance 1,25 à 1,6 du temps, en fonction de la géométrie (2 ou 3 dimensions) (Coudrier et al., 2005). D'autre part, lors du mouvement chimiotactique de *Dictyostelium*, des phases de progression rapide et rectiligne alternent régulièrement avec des phases plus lentes, où les changements de direction de la cellule sont plus important ((Shenderov and Sheetz, 1997), figure 4.5). La période de ce phénomène est d'environ 2 à 3 minutes.

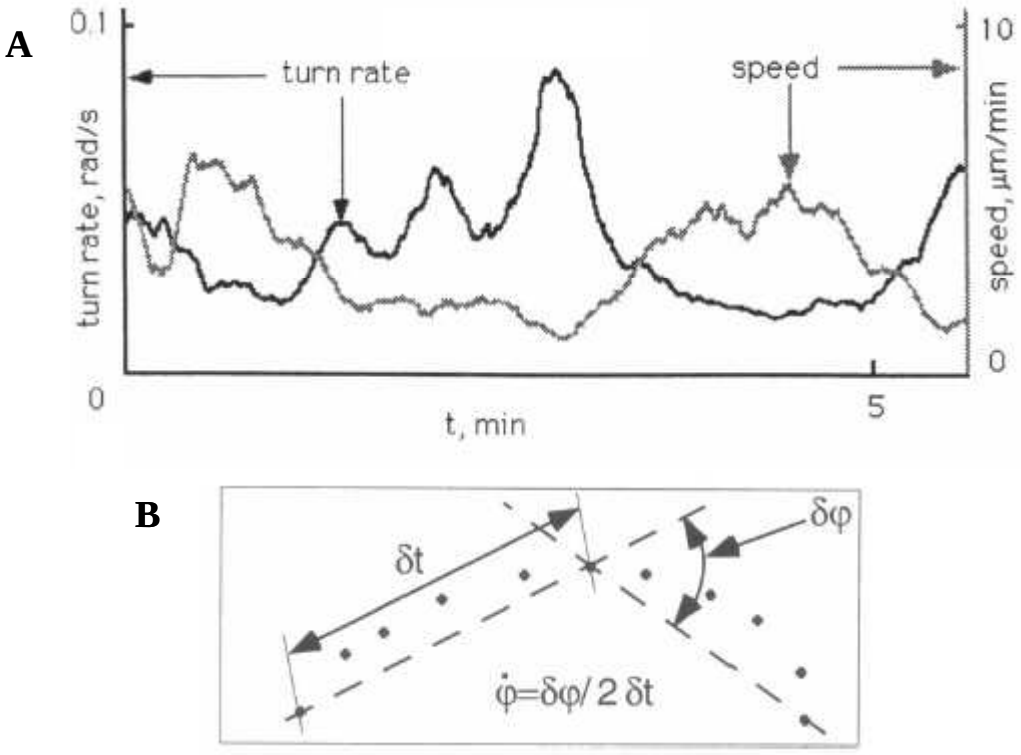


Fig 4.5 : La motilité de Dictyostelium discoideum n'est pas une simple marche aléatoire.
***A :** La vitesse et le taux de changement de direction (turn rate) de cellules se déplaçant dans un gradient chimique sont représentés en fonction du temps. Les deux grandeurs oscillent en opposition de phase.*

***B :** Définition du taux de changement de direction $\dot{\phi}$. On utilise les points situés à t + δt, t et t - δt pour mesurer les variations d'orientation. δt est fixé à 38,4s (Shenderov and Sheetz, 1997).*

Lorsqu'une cellule est bien polarisée dans un gradient chimiotactique, en cas d'inversion du gradient, elle fait demi-tour plutôt que de renverser sa polarisation. Dans un gradient, les zones de protrusions et les zones de rétractions sont donc assez stables, ce qui permet probablement à la cellule d'avancer vite. Néanmoins, il est aussi important pour la cellule de pouvoir « corriger le tir » si elle se dirige dans une mauvaise direction, ce qui suppose d'être

capable de remettre en cause la polarisation acquise et stabilisée. Dans cette optique, une activité périodique capable de modifier la direction de polarisation de la cellule pourrait être essentielle pour un déplacement efficace.

Enfin, je souhaite revenir sur un dernier point à propos de ces oscillations : elles paraissent étonnamment bien conservées d'une cellule à l'autre, et nous n'avons pu relier la période des protrusions à une caractéristique propre à chaque cellule, comme sa taille par exemple. Pourtant, nous avons vu que différentes cellules possédaient des vitesses d'étalement et atteignaient des aires totalement différentes à la fin de l'étalement, avec un temps caractéristique propre à chaque cellule, $1 / \alpha$. Ce temps est forcément relié, d'une manière ou d'une autre, à l'activité des protrusions puisqu'il contrôle la durée de l'étalement. Lorsque nous avons fait la corrélation entre courbe de protrusions et aires gagnées sur les films, nous avons vu qu'un pic de gain d'aire ne correspond pas forcement à lui tout seul à l'apparition d'un pseudopode dans une direction, et qu'à des temps plus grands que la période des pics individuels, on trouve également des périodes où l'activité de protrusion est importante et d'autres ou elle est très réduite. Il pourrait être intéressant de chercher l'éventuelle régularité de chaque cellule à des temps plus grand, et de corréler cela à des changements d'activité ou de direction comme nous avons commencé à le faire. En lien avec les travaux de Shenderov, on pourrait par exemple se demander si les cellules qui s'étalent vite s'étalent de manière plus polarisée que les autres.

4.3 Rôle du calcium dans l'étalement et la motilité cellulaire induite par un flux

Nous avons vu que la concentration en calcium extracellulaire a une influence sur la cinétique de l'étalement. Les cellules s'étalant en tampon SB + 500µM $CaCl_2$ ont une vitesse initiale d'étalement qui vaut pratiquement deux fois celle de cellules s'étalant en tampon SB. En revanche, les aires maximales atteintes ne semblent pas différentes, et nous n'avons pas observé de différence significative au niveau des aires gagnées et perdues après l'étalement.

Dans nos expériences d'étalement cellulaire, le calcium semble donc influer uniquement sur l'activité de protrusion des cellules, et pas sur l'activité de rétraction. D'autre part, l'absence d'effet du calcium à la fin de l'étalement semble indiquer que cet effet n'est présent que si la tension membranaire n'est pas trop importante. On peut imaginer que le calcium augmente le

turnover des filaments d'actine, sans augmenter la force que le cytosquelette d'actine est capable de produire.

Cet effet sur les protrusions lors de l'étalement semble trop limité pour expliquer l'augmentation de la vitesse de cellules soumises à un flux en présence de calcium. On peut penser qu'un autre phénomène intervient lorsque la cellule est soumise à une contrainte mécanique. F.Chamaraux a étudié la réponse de cellules *Dictyostelium* à une contrainte : l'expérience consiste à aspirer une portion (appelée langue) de la cellule à l'intérieur d'une micropipette, en exerçant une aspiration de l'ordre de -2000 Pa (dépression). Puis on diminue l'aspiration à une valeur donnée et on mesure le déplacement de la langue. Suivant la valeur de l'aspiration, la cellule peut rétracter la langue et sortir de la pipette, ne pas bouger, ou rentrer dans la pipette ((Chamaraux, 2005) et figure 4.6).

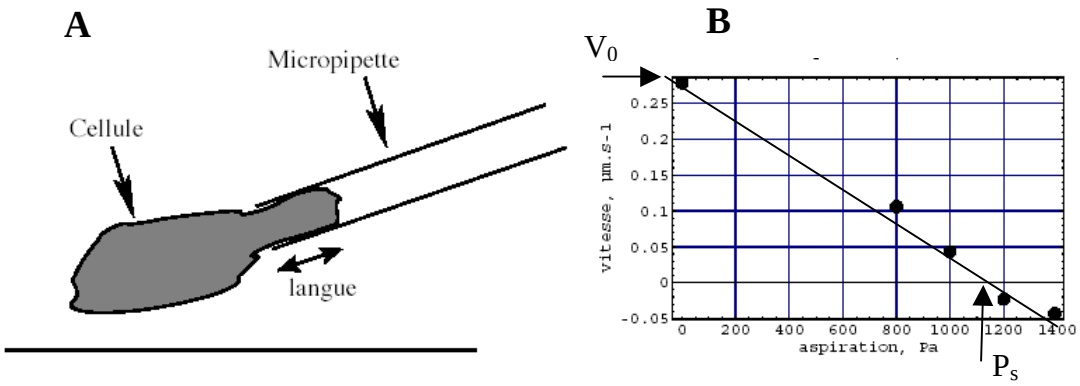


Fig 4.6 : *Expérience de caractérisation des forces de rétraction : **A :** schéma du dispositif : une « langue » de cellule est aspirée dans une micropipette, puis la dépression est réduite et on mesure la vitesse à laquelle la langue sort de la micropipette en fonction de la dépression appliquée. **B :** Exemple de diagramme Vitesse de sortie de la langue/Dépression dans la micropipette, valeurs moyennes pour 5 cellules Ax2 en présence de calcium. Par convention, les valeurs des dépressions sont notées positivement (Chamaraux, 2005).*

Deux grandeurs caractéristiques sont extraites de ces expériences : La pression d'arrêt P_s, pour laquelle la langue est immobile, et la vitesse V_0 à pression d'aspiration nulle. F. Chamaraux a constaté que l'ajout de calcium extracellulaire ne modifiait pas la pression d'arrêt, mais augmentait V_0 de 0,16µm/s à 0,28µm/s. Cela pourrait indiquer que suite à une stimulation mécanique importante (aspiration initiale), le calcium stimule la dynamique des rétractions, mais ne modifie pas la force que ces rétractions sont capables de produire. On peut remarquer que dans cette expérience, l'ajout de calcium augmente V_0 d'un facteur 1,8, ce qui est proche des différences de pente observées pour les protrusions lors de l'étalement.

Les deux effets (sur les protrusions comme observé lors de l'étalement et sur les rétractions) pourraient se cumuler dans les cellules soumises à une contrainte hydrodynamique pour expliquer l'augmentation de la vitesse, avec par exemple une stimulation des rétractions liée à une signalisation calcique, qui pourrait induire une diminution de la tension membranaire et l'augmentation de l'activité de protrusion. Pour tester l'importance de la tension membranaire dans notre système, il pourrait être intéressant de modifier ce paramètre, par exemple en introduisant dans le milieu de faibles concentrations de détergent (Raucher and Sheetz, 2000).

Autre point à prendre en compte : lors de l'étalement, nous mesurons des variations d'aires et non directement des vitesses. Suivant la localisation des protrusions et leur durée de vie, une cellule peut gagner de l'aire de manière plus ou moins efficace, et ainsi se déplacer plus ou moins vite. Il pourrait être intéressant de quantifier l'efficacité des protrusions et de relier cette information à la vitesse des cellules.
Enfin, dernier élément concernant l'effet du calcium sur la motilité cellulaire induite par un flux hydrodynamique : les travaux que j'ai réalisés sur PKD2 et TPC semblent indiquer que ces canaux ne sont pas impliqués dans la signalisation calcique liée à la motilité induite par un flux. Ces travaux restent à confirmer, notamment en ce qui concerne l'effet de la surexpression de PKD2, mais jusqu'à présent, le seul canal connu pour participer à cette réponse calcique est le canal correspondant au récepteur à l'IP3. Sa localisation chez *Dictyostelium* n'est pas connue. Il serait important d'étudier cette localisation pour voir si ce canal ne pourrait pas se trouver, même partiellement, à la membrane plasmique des cellules *Dictyostelium* et être ainsi le seul canal responsable de la réponse calcique observée dans la motilité induite par un flux hydrodynamique.

4.4 Rôle de Phg2 dans l'étalement et la motilité cellulaire

4.4.1 Phg2 et la polarisation cellulaire

Lors de ma thèse, j'ai cherché à déterminer le rôle de la protéine Phg2 dans la motilité cellulaire. Lors de l'étalement sur une surface, les cellules phg2Δ ont un défaut marqué de polarisation : on observe la formation de protrusions, de forme ronde et très larges, sur tout le pourtour des cellules. Ce défaut de polarisation pourrait impliquer une mauvaise régulation de

la dynamique du cytosquelette d'actine, puisque après quelques minutes de sédimentation sur une surface, les cellules dépourvues de phg2 présentent des amas de filaments d'actine au niveau de la zone de contact avec le substrat.

Quels domaines de Phg2 sont impliqués dans cette polarisation cellulaire ? Les cellules phg2Δ exprimant Phg2 dépourvue du domaine de liaison aux protéines de type Ras ont une polarisation déficiente et une motilité réduite. Leur morphologie lors de l'étalement est néanmoins assez différente de celle des cellules phg2Δ : si des protrusions apparaissent dans toutes les directions, elles sont plutôt étroites et allongées. En revanche, le domaine kinase de Phg2 n'est indispensable ni à la polarisation cellulaire lors de l'étalement, ni à la motilité cellulaire. Cela ne veut pas dire qu'il ne joue aucun rôle sur les protrusions : les cellules dépourvues de ce domaine présentent des protrusions larges et rondes comme celles des cellules phg2Δ. Enfin, les cellules exprimant seulement Phg2ΔNter ont également une polarisation et une motilité déficiente, provenant probablement du fait que la protéine n'est pas recrutée à la membrane et ne peut donc interagir avec ses partenaires à cet endroit.

On peut tirer deux conclusions de ces observations : tout d'abord, le défaut de polarisation est probablement à l'origine du défaut de motilité des cellules phg2Δ. D'autre part, le défaut observé lors de l'étalement de phg2Δ est double : un défaut de polarisation, lié au Ras Binding Domain, et un défaut plus local, impliquant la forme des protrusions et donc probablement le contrôle de la polymérisation de l'actine. Par quel moyen moléculaire Phg2 influence ces deux processus ?

4.4.2 Les partenaires de Phg2 : Phg2 et la phosphorylation des myosines II

Les substrats du domaine kinase n'ont pas été identifiés avec certitude. Le groupe de R. Firtel a montré que Phg2 induit la phosphorylation transitoire de la myosine II dans des cellules stimulées par de l'AMPc ((Jeon et al., 2007), voir figure 4.7). Cette phosphorylation n'est pas observée dans les cellules phg2Δ, ni dans les cellules phg2Δ exprimant Phg2 privée du domaine de liaison aux protéines de type Ras. De plus, l'ajout de latrunculine A ou de LY294002 ne modifie pas la réponse, ce qui suggère que cette voie de signalisation impliquant Phg2 ne dépend ni de la polymérisation d'actine, ni du PIP_3.

Cet article démontre également que cette phosphorylation se fait sur les chaînes lourdes de la myosine II et implique les Myosines Heavy Chain kinases, en aval de Phg2. Enfin, cette voie de signalisation implique également en amont la petite protéine G Rap1, identifiée comme interagissant avec Phg2 via le RBD.

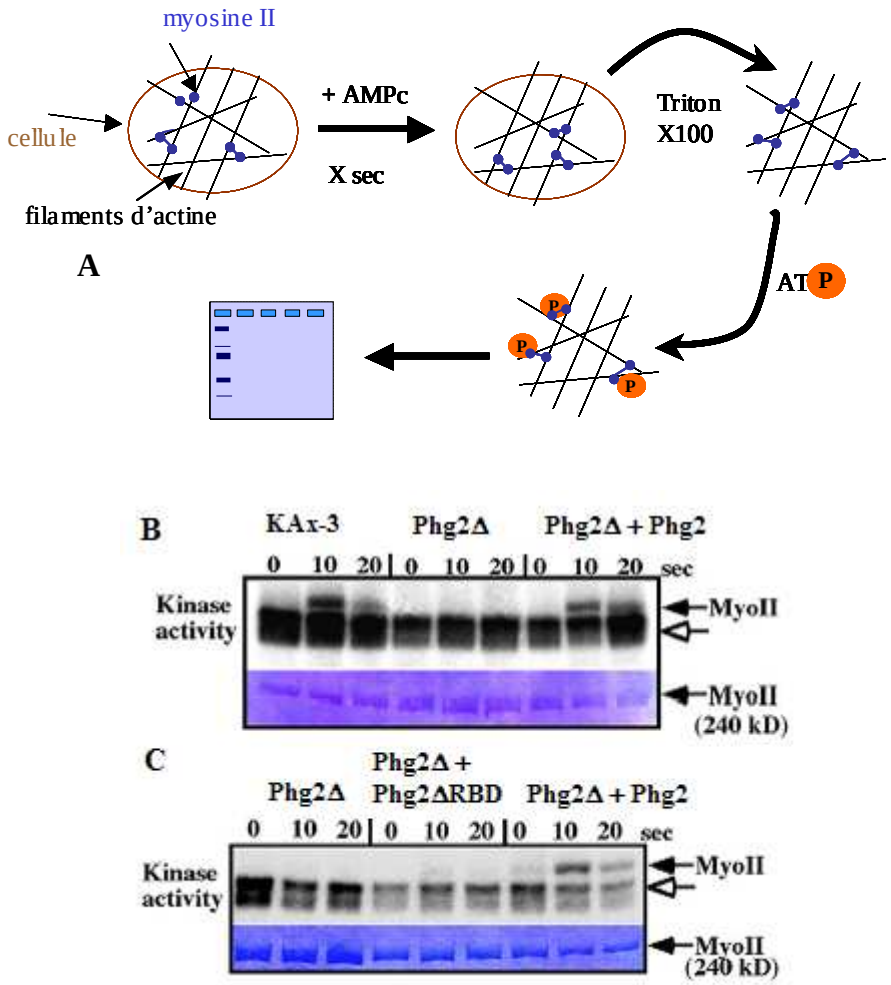


*Fig 4.7: Phosphorylation par Phg2 des chaînes lourdes de la myosine II associée au cytosquelette . **A** : principe de l'expérience : Des cellules sont stimulées à l'AMPc pendant le temps indiqué, puis les cytosquelettes sont extraits par du Triton X100. Les cytosquelettes sont soumis à un test d'activité kinase (incubation en présence de [^{32}P]ATP), puis déposés sur un gel SDS PAGE, coloré au bleu de Coomassie (B et C, bas de chaque panneau). L'incorporation de ^{32}P dans les protéines est repérée grâce à un autoradiogramme du gel (B et C, haut de chaque panneau). **B :** Activité kinase d'extraits de cellules KAx-3, phg2Δ, et phg2Δ exprimant Phg2. **C :** Activité kinase d'extraits de cellules phg2Δ, et phg2Δ exprimant Phg2ΔRBD et phg2Δ exprimant Phg2. Les flèches noires indique la position de la myosine II, les flèches blanches celle d'une protéine non identifiée. (Jeon et al., 2007)*

Le groupe de Pierre Cosson a identifié un autre partenaire de Phg2, Adrm1 (Cherix et al., 2006). Mais ce partenaire semble impliqué dans une toute autre voie de signalisation, liée à la perception de la concentration en nutriments et au déclenchement du développement. En effet, en présence de milieu de culture HL5 dilué, les cellules adrm1Δ commencent à se développer si la concentration en nutriments descend à 25 % de la concentration standard, alors qu'il faut descendre à 15% ou moins pour assister au même phénomène dans la souche AX2 parentale. Les résultats sont les mêmes pour les cellules phg2Δ et leur souche parentale DH1, même si les concentrations limites varient entre AX2 et DH1 (respectivement 2% et 11% pour DH1 et phg2Δ). Adrm1 interagit via un domaine placé juste à côté de celui impliqué dans l'interaction de Phg2 avec Rap1 (figure 4.8).

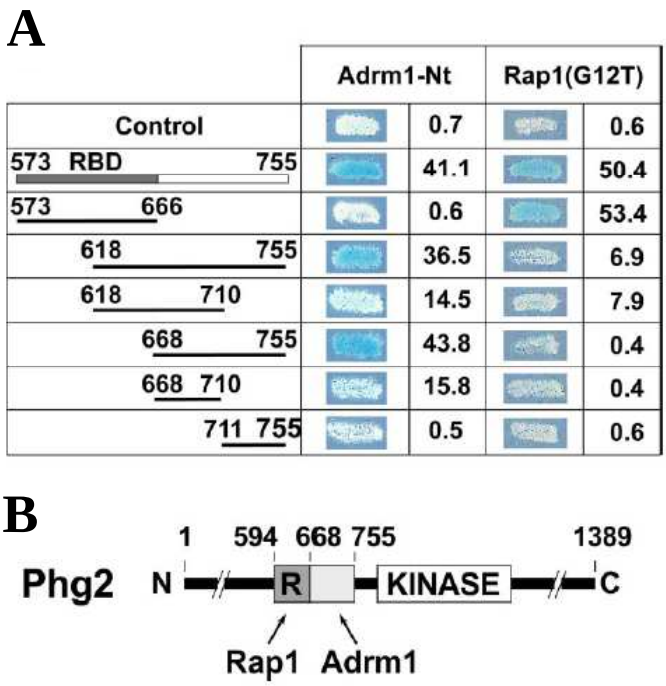


Fig 4.8: Phg2 interagit avec Rap1 et Adrm1 : ***A :*** *Test double hybride d'interaction entre différents fragments de Phg2 et, respectivement, le domaine N-terminal de Adrm1 et une forme constitutivement active de Rap1. L'interaction entre les deux protéines induit la production de β-galactosidase et la coloration en bleu du milieu. La colonne de droite donne une mesure relative de la production de β-galactosidase (unité arbitraire). Les fragments 573-666 et 668-755 sont les fragment interagissant le mieux avec respectivement Rap1 et Adrm1.* ***B :*** *Localisation des domaines de Phg2 interagissant avec Rap1 et Adrm1. (Cherix et al., 2006)*

On peut remarquer que dans les constructions que nous avons utilisées, notamment Phg2ΔRBD, le domaine de la protéine retiré va des acides aminés 587 à 713 et élimine donc

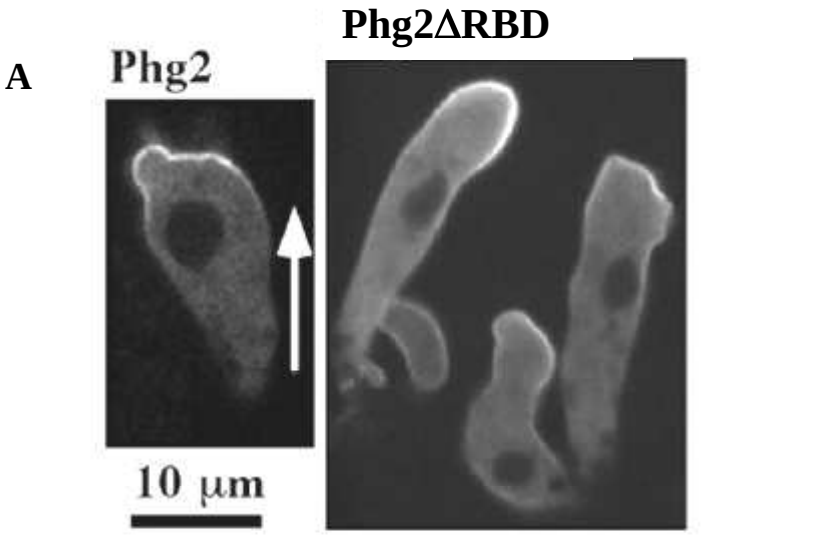
également l'interaction avec Adrm1. En dehors de cette différence de seuil de déclenchement du développement, les cellules dépourvues de Adrm1 croissent et forment des fructifications normalement. Leur motilité n'a pas été testée. De plus, Adrm1 est un orthologue de ARM1 (pour adhesion-regulating molecule), que l'on retrouve dans les cellules de mammifère et qui est notamment impliqué dans l'adhésion entre cellules endothéliales et lymphocytes (Lamerant and Kieda, 2005). Adrm1 pourrait donc peut être avoir d'autres fonctions chez *Dictyostelium*, en lien avec l'adhésion ou la motilité.

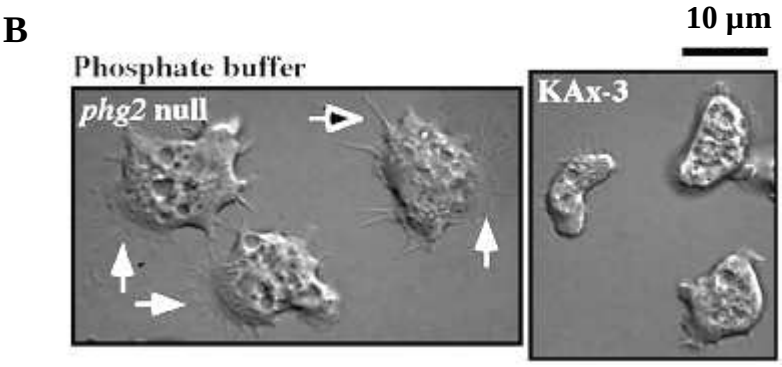
En dehors de ces travaux sur la phosphorylation de la myosine II, le groupe de R. Firtel a observé une localisation au front avant de GFP-Phg2 dans les cellules répondant à un signal chimiotactique. Néanmoins, ce signal est moins localisé que le front de PIP_3 par exemple, et la localisation à la membrane ne dépend ni du PIP_3 (testé par l'ajout de LY294002 et l'expression de GFP-Phg2 dans des cellules dépourvues des PI3-kinases 1 et 2), ni de la polymérisation d'actine (testé par l'ajout de latrunculine A).
Ils observent également que les cellules phg2Δ présentent de larges pseudopodes et de nombreux filopodes comparées aux cellules sauvages. Elles émettent également beaucoup de pseudopodes latéraux lors du déplacement vers une source de chimioattractant. Il en résulte une vitesse chimiotactique réduite de moitié par rapport à la souche sauvage, et des changements de direction plus fréquents.
La dynamique du cytosquelette d'actine est aussi modifiée dans les cellules phg2Δ. Le niveau moyen de F-actine est 1,5 fois plus important que dans les cellules sauvages, et la quantité de myosine II associée au cytosquelette est également légèrement supérieure (30%).

Il convient de signaler que le groupe de R.Firtel n'a pas utilisé les même cellules que nous. En effet, ils ont réalisé un mutant nul à partir de la souche sauvage KAx-3. Contrairement à ce que nous avons pu mesurer, ils observent une augmentation de l'adhésion cellulaire dans les cellules phg2Δ. Néanmoins, leur protocole de mesure diffère sensiblement du notre, notamment au niveau du temps d'adhésion et des concentrations de cellules utilisées. Ces deux éléments pourraient expliquer les différences d'adhésion observées. En dehors de ce point particulier, les résultats obtenus par le groupe de Firtel corrèlent et complètent assez bien ceux que l'on a obtenus. L'existence de larges pseudopodes, et de pseudopodes latéraux lors du chimiotactisme se retrouve dans nos observations sur l'étalement, nous confortant dans l'idée que c'est bien un problème de polarisation cellulaire qui ralentit la cellule.

Ils observent également que la dynamique du cytosquelette d'actine est perturbée, ce qui renvoie aux amas d'actine observés au niveau de la zone de contact avec le substrat après quelques minutes d'étalement.

Enfin, concernant la localisation de Phg2, en partant de cellules en phase d'agrégation, ils obtiennent une distribution plus localisée au front avant que ce que l'on a pu observer (figure 4.9).





C

	Speed (µm/min)	Direct. Change (deg)
KAx-3	11.8+/-3.4	27.5+/-6.55
phg2⁻	6.47+/-0.98	48.15+/-4.8

*Figure 4.9 : Morphologie et chimiotactisme des cellules phg2Δ obtenues à partir de la souche KAx-3 : **A** : Localisation de GFP-Phg2 et GFP-Phg2ΔRBD au front avant de cellules se déplaçant dans un gradient d'AMPc. La flèche indique la direction du mouvement. **B** : Morphologie de cellules phg2Δ et KAx-3 (souche sauvage) étalées sur une surface en tampon phosphate. Les cellules phg2Δ présentent de larges lamellipodes (flèches blanches) et de nombreux filopodes (flèches noires) comparées aux cellules KAx-3. **C** : Analyse du chimiotactisme de Phg2Δ par le logiciel DIAS ((Soll, 1995), (Wessels et al., 2004)). La vitesse du centre de gravité des cellules est indiquée, ainsi qu'un facteur décrivant la propension relative des cellules à changer de direction (plus la valeur est grande, plus les cellules changent fréquemment de direction). (Jeon et al., 2007)*

4.4.3 Rôle proposé pour les différents domaines de Phg2

L'action de Phg2 sur la myosine II via son domaine d'interaction à Rap1 pourrait expliquer l'importance du domaine RBD pour la polarisation cellulaire observée dans mes résultats. En effet, comme on l'a vu dans l'introduction, la phosphorylation des chaînes lourdes de la myosine II favorise le désassemblage des oligomères de myosine II, associés au cytosquelette d'actine, qui sont responsables des forces de contraction dans la cellule. La disparition locale des myosines II associées au cytosquelette pourrait favoriser l'apparition locale de protrusions en diminuant la cohésion de l'association cytosquelette/membrane. Lors des expériences de chimiotactisme réalisées par R. Firtel, Phg2 et la forme active de Rap1 sont recrutés au front avant de la cellule. Phg2 pourrait permettre la polarisation des cellules en permettant l'apparition de protrusions préférentiellement au niveau du front avant de la cellule.
Dans les cellules que j'ai utilisées, cellules en phase végétative et issues de la souche parentale DH1, je n'ai pas observé de localisation préférentielle de Phg2. Néanmoins, je ne me suis pas intéressé à la localisation de la forme active de Rap1. Si Rap1-GTP est localisée à l'avant de la cellule, Phg2 pourrait être active au front avant, tout en étant localisée uniformément, et ainsi se comporter de la même manière que dans les cellules de R.Firtel.
Suivant cette hypothèse, les cellules phg2Δ devraient présenter des concentrations importantes de myosine II associées au cytosquelette sur tout le pourtour cellulaire. Faute de présenter des directions privilégiées, elles pourraient essayer de faire des protrusions dans toutes les directions. La présence de myosine II sur tout le bord cellulaire pourrait également être à l'origine de la rétraction des protrusions nouvellement formées, ce qui empêcherait la formation de protrusions stables et donc la polarisation et le mouvement. Il semble en effet, comme on l'a vu, que les cellules phg2Δ soumises à un flux hydrodynamique émettent des protrusions mais les rétractent rapidement.

En revanche, si Phg2 participe à la phosphorylation des chaînes lourdes des myosines II, ce n'est pas via son domaine kinase, puisque celui-ci n'est pas indispensable à la bonne polarisation au vu du comportement des cellules phg2Δ exprimant Phg2Δkinase. Quel peut donc être le rôle de ce domaine kinase ? On a vu que dans les constructions exprimant le domaine kinase de Phg2, les protrusions étaient plutôt étroites et allongées, alors qu'en son absence, les protrusions sont plus rondes et larges et donnent l'impression d'avancer plus lentement. Ce phénotype rappelle celui de cellules dans lesquelles le niveau d'expression de

protéines de type Ena/VASP est modifié. Ena/VASP est localisée dans les structures ou l'actine polymérise, comme les lamellipodes ou les filopodes, et entre en compétition avec les protéines de coiffe pour l'organisation des filaments d'actine : plus il y a d'Ena/VASP, moins les filaments sont branchés ((Krause et al., 2002) et figure 4.10).

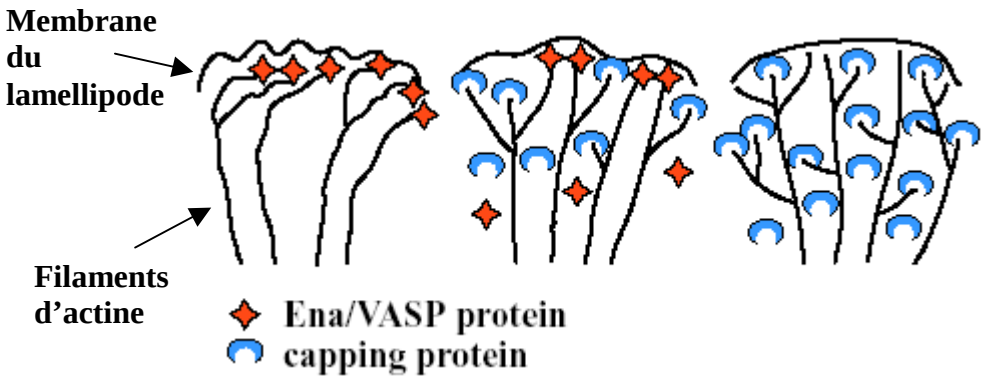


Fig 4.10 : *Fonction d'Ena/VASP, compétition avec les protéines de coiffe pour la ramification des filaments d'actine :*
Plus la concentration en protéines de coiffe est importante et plus la concentration en Ena/VASP est faible, plus les filaments d'actine sont ramifiés. (Krause et al., 2002)

Au niveau des lamellipodes dans les fibroblastes, l'activité d'Ena/VASP est corrélée à une avancée rapide de lamellipodes plutôt étroit et peu stables, alors qu'à l'inverse l'absence de ces protéines conduit à des lamellipodes plus larges, dont l'avancée est plus lente. Ces lamellipodes sont également plus stables. En conséquence, chez les fibroblastes, le déplacement cellulaire est plus important dans les cellules au niveau d'expression d'Ena/VASP réduit.
De plus, une protéine nommée RIAM (pour Rap1-GTP Interacting Adaptor Molecule) a été identifiée dans des cellules humaines (Lafuente et al., 2004). Cette protéine interagit avec Rap1, comme son nom l'indique, mais aussi avec Ena/VASP, et régule la polymérisation d'actine, l'adhésion et l'étalement cellulaire. Cette protéine ne contient pas de domaine kinase, mais possède en plus du domaine de liaison à Rap1, un domaine PH et plusieurs domaine riches en prolines.

Phg2 ne présente pas d'homologie de séquence importante avec RIAM, même si on retrouve les trois domaines décrits ci-dessus. En revanche, il a été montré que Ena/VASP peut être phosphorylé et que cette phosphorylation régule la formation de filopodes (Gomez and Robles, 2004). Le domaine kinase de Phg2 pourrait donc jouer, directement ou indirectement,

sur des protéines comme Ena/VASP, régulant le caractère plus ou moins ramifié du cytosquelette d'actine. Il existe d'ailleurs chez *Dictyostelium* un homologue de VASP, qui contrôle la formation de filopodes (Han et al., 2002).

4.5 Perspectives

Ces réflexions appellent de nouvelles questions, qui pourraient constituer des pistes pour poursuivre ces travaux de thèse :

Tout d'abord, nous avons caractérisé l'étalement cellulaire et mis en évidence l'existence d'oscillations. Il serait intéressant d'identifier les molécules à l'origine de ces oscillations, et de comprendre leur rôle. On pourrait pour cela étudier des cellules possédant des défauts de motilité, liés par exemple à l'absence de certaines protéines du cytosquelette d'actine (profiline, Ena/VASP, etc). Une étude statistique plus poussée de ces oscillations est aussi possible. Il pourrait être intéressant de relier comme on a essayé de le faire ces oscillations à des changements de direction de la cellule.

Ensuite, nous avons émis des hypothèses sur le rôle des différents domaines de la protéine Phg2. Pour vérifier ces hypothèses, on pourrait étudier l'étalement de cellules *Dictyostelium* dépourvues de VASP, ou l'état d'activation de cette même protéine en fonction de la présence ou de l'absence de Phg2. La régulation de Phg2 semble complexe, et il pourrait aussi être intéressant d'identifier d'éventuels autres partenaires.

Enfin, concernant la mecano-sensibilité et la signalisation calcique liée à la motilité induite par un flux, on pourrait s'intéresser au gène mis de côté au début de cette étude et qui code pour une protéine homologue de la mucolipine. Il faudrait également faire une caractérisation plus poussée de la fonction du récepteur à l'IP3 de *Dictyostelium*, puisque par exemple la localisation de ce dernier n'est pas connue avec certitude. Il est également possible de continuer l'étude de PKD2 et TPC, même si ces deux protéines ne semblent pas impliquées dans la motilité, en utilisant si possible des inhibiteurs des canaux calciques assez spécifiques, ou en réalisant des expériences de patch-clamp pour caractériser les protéines et vérifier si il s'agit bien de canaux calciques.

5 BIBLIOGRAPHIE

Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M. and Ghazi, A. (1998). Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of Escherichia coli cells. *J Biol Chem* **273**, 26670-4.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. (1994). Biologie Moleculaire de la Cellule, 3ième édition.

Alberts, B., Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4ième édition: Garland Science Publishing.

Alenghat, F. J., Nauli, S. M., Kolb, R., Zhou, J. and Ingber, D. E. (2004). Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* **301**, 23-30.

Anyatonwu, G. I. and Ehrlich, B. E. (2004). Calcium signaling and polycystin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1364-73.

Aubry, L. and Firtel, R. (1999). Integration of signaling networks that regulate Dictyostelium differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 469-517.

Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* **3**, 466-72.

Bamburg, J. R., McGough, A. and Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* **9**, 364-70.

Benghezal, M., Cornillon, S., Gebbie, L., Alibaud, L., Bruckert, F., Letourneur, F. and Cosson, P. (2003). Synergistic control of cellular adhesion by transmembrane 9 proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 2890-9.

Blanc, C., Charette, S., Cherix, N., Lefkir, Y., Cosson, P. and Letourneur, F. (2005). A novel phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding domain targeting the Phg2 kinase to the membrane in Dictyostelium cells. *Eur J Cell Biol* **84**, 951-60.

Borisy, G. G. and Svitkina, T. M. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 104-12.

Bosgraaf, L., Russcher, H., Smith, J. L., Wessels, D., Soll, D. R. and Van Haastert, P. J. (2002). A novel cGMP signalling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in Dictyostelium. *Embo J* **21**, 4560-70.

Bray, D. (2001). Cell Movements, second edition: Garland publishing.

Bretschneider, T., Jonkman, J., Kohler, J., Medalia, O., Barisic, K., Weber, I., Stelzer, E. H., Baumeister, W. and Gerisch, G. (2002). Dynamic organization of the actin system in the motile cells of Dictyostelium. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 639-49.

Carlier, M. F., Le Clainche, C., Wiesner, S. and Pantaloni, D. (2003). Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays* **25**, 336-45.

Carlier, M. F., Wiesner, S., Le Clainche, C. and Pantaloni, D. (2003). Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro. *C R Biol* **326**, 161-70.

Chamaraux, F. (2005). Motilité cellulaire, quelques aspects expérimentaux et théoriques. In *Physique*. Grenoble: Université Joseph Fourier - Grenoble 1.

Chamaraux, F., Fache, S., Bruckert, F. and Fourcade, B. (2005). Kinetics of cell spreading. *Phys Rev Lett* **94**, 158102.

Charest, P. G. and Firtel, R. A. (2006). Feedback signaling controls leading-edge formation during chemotaxis. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 339-47.

Cherix, N., Froquet, R., Charette, S. J., Blanc, C., Letourneur, F. and Cosson, P. (2006). A Phg2-Adrm1 pathway participates in the nutrient-controlled developmental response in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **17**, 4982-7.

Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-24.

Coates, J. C. and Harwood, A. J. (2001). Cell-cell adhesion and signal transduction during Dictyostelium development. *J Cell Sci* **114**, 4349-58.

Comer, F. I. and Parent, C. A. (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.

Cornillon, S., Gebbie, L., Benghezal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle-Haller, B., Charette, S. J., Bruckert, F., Letourneur, F. and Cosson, P. (2006). An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep* **7**, 617-21.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275**, 34287-92.

Coudrier, E., Amblard, F., Zimmer, C., Roux, P., Olivo-Marin, J. C., Rigothier, M. C. and Guillen, N. (2005). Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by Entamoeba histolytica. *Cell Microbiol* **7**, 19-27.

De La Cruz, E. M., Ostap, E. M., Brundage, R. A., Reddy, K. S., Sweeney, H. L. and Safer, D. (2000). Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. *Biophys J* **78**, 2516-27.

De la Roche, M. A., Smith, J. L., Betapudi, V., Egelhoff, T. T. and Cote, G. P. (2002). Signaling pathways regulating Dictyostelium myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 703-18.

Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Fourcade, B. and Bruckert, F. (2002). Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J* **82**, 2383-95.

Decave, E., Rieu, D., Dalous, J., Fache, S., Brechet, Y., Fourcade, B., Satre, M. and Bruckert, F. (2003). Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci* **116**, 4331-43.

Delmas, P. (2004). Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* **118**, 145-8.

Delmas, P., Padilla, F., Osorio, N., Coste, B., Raoux, M. and Crest, M. (2004). Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1374-83.

Desban, N., Lissitzky, J. C., Rousselle, P. and Duband, J. L. (2006). alpha1beta1-integrin engagement to distinct laminin-1 domains orchestrates spreading, migration and

survival of neural crest cells through independent signaling pathways. *J Cell Sci* **119**, 3206-18.

Dobereiner, H. G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H. S. and Sheetz, M. P. (2004). Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys Rev Lett* **93**, 108105.

Dunn, G. A. and Zicha, D. (1995). Dynamics of fibroblast spreading. *J Cell Sci* **108 (Pt 3)**, 1239-49.

Eddy, R. J., Han, J., Sauterer, R. A. and Condeelis, J. S. (1996). A major agonist-regulated capping activity in Dictyostelium is due to the capping protein, cap32/34. *Biochim Biophys Acta* **1314**, 247-59.

Eichinger, L., Lee, S. S. and Schleicher, M. (1999). Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* **47**, 124-34.

Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q. et al. (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43-57.

Fache, S., Dalous, J., Engelund, M., Hansen, C., Chamaraux, F., Fourcade, B., Satre, M., Devreotes, P. and Bruckert, F. (2005). Calcium mobilization stimulates Dictyostelium discoideum shear-flow-induced cell motility. *J Cell Sci* **118**, 3445-57.

Fey, P., Stephens, S., Titus, M. A. and Chisholm, R. L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium. *J Cell Biol* **159**, 1109-19.

Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J. F., Torres, V., Yaniv, M. and Pontoglio, M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* **38**, 21-3.

Fisher, P. R. and Wilczynska, Z. (2006). Contribution of endoplasmic reticulum to Ca(2+) signals in Dictyostelium depends on extracellular Ca(2+). *FEMS Microbiol Lett* **257**, 268-77.

Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. and Ishiwata, S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol* **4**, 666-73.

Fukui, Y., Uyeda, T. Q., Kitayama, C. and Inoue, S. (2000). How well can an amoeba climb? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10020-5.

Fukui, Y., Yumura, S. and Yumura, T. K. (1987). Agar-overlay immunofluorescence: high-resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis. *Methods Cell Biol* **28**, 347-56.

Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L. and Firtel, R. A. (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* **109**, 611-23.

Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J. et al. (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **15**, 3915-25.

Gillespie, P. G., Dumont, R. A. and Kachar, B. (2005). Have we found the tip link, transduction channel, and gating spring of the hair cell? *Curr Opin Neurobiol* **15**, 389-96.

Gomez, T. M. and Robles, E. (2004). The great escape; phosphorylation of Ena/VASP by PKA promotes filopodial formation. *Neuron* **42**, 1-3.

Gonzalez-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A. E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P. C., Reisin, I. L., Arnaout, M. A. and Cantiello, H. F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca2+-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1182-7.

Hamill, O. P. and Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* **81**, 685-740.

Hamill, O. P. and McBride, D. W., Jr. (1996). A supramolecular complex underlying touch sensitivity. *Trends Neurosci* **19**, 258-61.

Han, Y. H., Chung, C. Y., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M. A., Soll, D. R. and Firtel, R. A. (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem* **277**, 49877-87.

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V. P., Guggino, W. B. and Germino, G. G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* **408**, 990-4.

Insall, R. H., Borleis, J. and Devreotes, P. N. (1996). The aimless RasGEF is required for processing of chemotactic signals through G-protein-coupled receptors in Dictyostelium. *Curr Biol* **6**, 719-29.

Janetopoulos, C., Ma, L., Devreotes, P. N. and Iglesias, P. A. (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.

Jeon, T. J., Lee, D. J., Merlot, S., Weeks, G. and Firtel, R. A. (2007). Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J Cell Biol* **176**, 1021-33.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. and Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.

Kimmel, A. R. and Parent, C. A. (2003). The signal to move: D. discoideum go orienteering. *Science* **300**, 1525-7.

Krause, M., Bear, J. E., Loureiro, J. J. and Gertler, F. B. (2002). The Ena/VASP enigma. *J Cell Sci* **115**, 4721-6.

Lafuente, E. M., van Puijenbroek, A. A., Krause, M., Carman, C. V., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T. A., Gertler, F. B. and Boussiotis, V. A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell* **7**, 585-95.

Lamerant, N. and Kieda, C. (2005). Adhesion properties of adhesion-regulating molecule 1 protein on endothelial cells. *Febs J* **272**, 1833-44.

Levi, S., Polyakov, M. and Egelhoff, T. T. (2000). Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid* **44**, 231-8.

Liang, W., Licate, L., Warrick, H., Spudich, J. and Egelhoff, T. (2002). Differential localization in cells of myosin II heavy chain kinases during cytokinesis and polarized migration. *BMC Cell Biol* **3**, 19.

Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A. and Loomis, W. F. (2004). Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* **304**, 875-8.

Malek, A. M. and Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)**, 713-26.

Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M. F. and Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5992-7.

Merlot, S. and Firtel, R. A. (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3471-8.

Minke, B. (1977). Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* **3**, 59-64.

Moran, M. M., Xu, H. and Clapham, D. E. (2004). TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 362-9.

Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J. et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* **33**, 129-37.

Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A. and Gerisch, G. (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.

Owens, N. F., Gingell, D. and Bailey, J. (1988). Contact-mediated triggering of lamella formation by Dictyostelium amoebae on solid surfaces. *J Cell Sci* **91 (Pt 3)**, 367-77.

Parent, C. A. (2004). Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 4-13.

Parent, C. A. and Devreotes, P. N. (1999). A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765-70.

Peiter, E., Maathuis, F. J., Mills, L. N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A. M. and Sanders, D. (2005). The vacuolar Ca2+-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**, 404-8.

Pierres, A., Eymeric, P., Baloche, E., Touchard, D., Benoliel, A. M. and Bongrand, P. (2003). Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys J* **84**, 2058-70.

Piper, R. C. and Luzio, J. P. (2004). CUPpling calcium to lysosomal biogenesis. *Trends Cell Biol* **14**, 471-3.

Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

Pring, M., Cassimeris, L. and Zigmond, S. H. (2002). An unexplained sequestration of latrunculin A is required in neutrophils for inhibition of actin polymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* **52**, 122-30.

Raper, K. B. and Smith, N. R. (1939). The Growth of Dictyostelium discoideum upon Pathogenic Bacteria. *J Bacteriol* **38**, 431-45.

Raucher, D. and Sheetz, M. P. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* **148**, 127-36.

Reinhart-King, C. A., Dembo, M. and Hammer, D. A. (2005). The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J* **89**, 676-89.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* **153**, 1175-86.

Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., De Vos, K., Sheetz, M. et al. (2001). Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase. *J Cell Sci* **114**, 1221-7.

Sawada, Y. and Sheetz, M. P. (2002). Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* **156**, 609-15.

Schafer, D. A., Welch, M. D., Machesky, L. M., Bridgman, P. C., Meyer, S. M. and Cooper, J. A. (1998). Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol* **143**, 1919-30.

Schleicher, M. and Noegel, A. A. (1992). Dynamics of the Dictyostelium cytoskeleton during chemotaxis. *New Biol* **4**, 461-72.

Sengupta, K., Aranda-Espinoza, H., Smith, L., Janmey, P. and Hammer, D. (2006). Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophys J* **91**, 4638-48.

Shenderov, A. D. and Sheetz, M. P. (1997). Inversely correlated cycles in speed and turning in an ameba: an oscillatory model of cell locomotion. *Biophys J* **72**, 2382-9.

Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewohner, J., Gerisch, G. and Sackmann, E. (1998). Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys J* **74**, 514-22.

Soll, D. R. (1995). The use of computers in understanding how animal cells crawl. *Int Rev Cytol* **163**, 43-104.

Strassmaier, M. and Gillespie, P. G. (2002). The hair cell's transduction channel. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 380-6.

Sukharev, S. and Anishkin, A. (2004). Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends Neurosci* **27**, 345-51.

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.

Traynor, D., Milne, J. L., Insall, R. H. and Kay, R. R. (2000). Ca(2+) signalling is not required for chemotaxis in Dictyostelium. *Embo J* **19**, 4846-54.

Uchida, K. S., Kitanishi-Yumura, T. and Yumura, S. (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 Yumura, S. (2004). Dynamics of novel feet of Dictyostelium cells during migration. *J Cell Sci* **117**, 1443-55.

Ueda, M., Graf, R., MacWilliams, H. K., Schliwa, M. and Euteneuer, U. (1997). Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9674-8.

Weber, I., Wallraff, E., Albrecht, R. and Gerisch, G. (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., Neilsen, P. O., Prestwich, G. D., Kirschner, M. W., Cantley, L. C. and Bourne, H. R. (2002). A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol* **4**, 509-13.

Wessels, D., Brincks, R., Kuhl, S., Stepanovic, V., Daniels, K. J., Weeks, G., Lim, C. J., Spiegelman, G., Fuller, D., Iranfar, N. et al. (2004). RasC plays a role in transduction of temporal gradient information in the cyclic-AMP wave of Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell* **3**, 646-62.

Wilczynska, Z., Happle, K., Muller-Taubenberger, A., Schlatterer, C., Malchow, D. and Fisher, P. R. (2005). Release of Ca2+ from the endoplasmic reticulum contributes to Ca2+ signaling in Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell* **4**, 1513-25.

Williams, K. L., Kessin, R. H. and Newell, P. C. (1974). Genetics of growth in axenic medium of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Nature* **247**, 142-3.

Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T. and Bourne, H. R. (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201-14.

Yamada, K. M. and Geiger, B. (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 76-85.

6 Annexes : Publications

EMBO reports

scientific report

An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium* amoebae with integrin β features

Sophie Cornillon[1], Leigh Gebbie[1], Mohammed Benghezal[1†], Prashant Nair[1], Sebastien Keller[2], Bernhard Wehrle-Haller[1], Steve J. Charette[1], Franz Brückert[2], François Letourneur[3] & Pierre Cosson[1+]

[1]Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Centre Médical Universitaire, Geneva, Switzerland, [2]Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR314 CNRS, CEA, Grenoble, France, and [3]IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland, Institut de Biologie et de Chimie des Protéines, UMR 5086, CNRS/Université Lyon I, Lyon, France

The study of free-living amoebae has proven valuable to explain the molecular mechanisms controlling phagocytosis, cell adhesion and motility. In this study, we identified a new adhesion molecule in *Dictyostelium* amoebae. The SibA (Similar to Integrin Beta) protein is a type I transmembrane protein, and its cytosolic, transmembrane and extracellular domains contain features also found in integrin β chains. In addition, the conserved cytosolic domain of SibA interacts with talin, a well-characterized partner of mammalian integrins. Finally, genetic inactivation of *SIBA* affects adhesion to phagocytic particles, as well as cell adhesion and spreading on its substrate. It does not visibly alter the organization of the actin cytoskeleton, cellular migration or multicellular development. Our results indicate that the SibA protein is a *Dictyostelium* cell adhesion molecule presenting structural and functional similarities to metazoan integrin β chains. This study sheds light on the molecular mechanisms controlling cell adhesion and their establishment during evolution.

Keywords: adhesion; *Dictyostelium*; integrin; motility; talin

EMBO reports (2006) **7**, 617–621. doi:10.1038/sj.embor.7400701

INTRODUCTION

Cell–substrate adhesion is a crucial step in many biological processes such as development, wound healing, metastasis and phagocytosis. In mammalian cells, several proteins are involved in cellular adhesion, in particular cell-surface receptors, signalling molecules and components of the actin cytoskeleton. Integrin-mediated cell adhesion is one of the most widely studied adhesion mechanisms. Integrins are heterodimeric type I transmembrane proteins composed of one α-subunit and one β-subunit, which bind to the extracellular matrix by their extracellular domain and control cell spreading, migration, proliferation and survival (Schwartz, 2001).

The amoeba *Dictyostelium discoideum* is a widely used model to study cellular adhesion, phagocytosis and the dynamics of the actin cytoskeleton. This unicellular organism is amenable to genetic analysis, mainly owing to its fully sequenced haploid genome (Eichinger *et al*, 2005). Many gene products have been implicated in various aspects of the phagocytic process in *Dictyostelium* on the basis of the analysis of targeted knockout mutants (Bracco *et al*, 2000) or of mutants identified in random genetic screenings (Cornillon *et al*, 2000; Fey *et al*, 2002; Gebbie *et al*, 2004). Nevertheless, the receptors controlling the adhesion of free-living *Dictyostelium* cells to their substrate and to phagocytic particles have not been unambiguously identified.

Here, we report the identification and characterization of a *Dictyostelium* adhesion molecule, named SibA, which presents several features also found in mammalian integrin β chains. These results may shed light on the origin of adhesion molecules in evolution.

RESULTS AND DISCUSSION

SibA, a membrane protein involved in phagocytosis

To identify new genes involved in phagocytosis, we mutagenized *Dictyostelium* cells by random insertion of a plasmid, and selected a mutant defective for phagocytosis of fluorescent latex beads. On the basis of its resemblance to integrins (see below), the corresponding gene was named *SIBA* (Similar to Integrin Beta). In the *sibA* mutant, the mutagenic plasmid is inserted in the DDB0187447 gene (Fig 1A), resulting in the absence of the corresponding transcript (Fig 1B). The SibA protein (1,928 amino-acid residues) has a putative endoplasmic reticulum insertion signal sequence at its amino terminus (position 1–21) and a transmembrane domain towards its carboxyl terminus (position 1859–1881), suggesting that it is a type I transmembrane protein. Indeed, cell-surface biotinylation followed by immunoprecipitation

[1]Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Centre Médical Universitaire, 1 rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland
[2]Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR314 CNRS, CEA, 38054 Grenoble, France
[3]IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland, Institut de Biologie et de Chimie des Protéines, UMR 5086, CNRS/Université Lyon I, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France
[†]Present address: Athelas SA, Chemin des Aulx 18, 1228 Plan-les-Ouates, Switzerland
[+]Corresponding author. Tel: +41 22 702 5293; Fax: +41 22 702 5260;
E-mail: pierre.cosson@medecine.unige.ch

Received 21 November 2005; revised 16 February 2006; accepted 15 March 2006; published online 12 May 2006

©2006 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

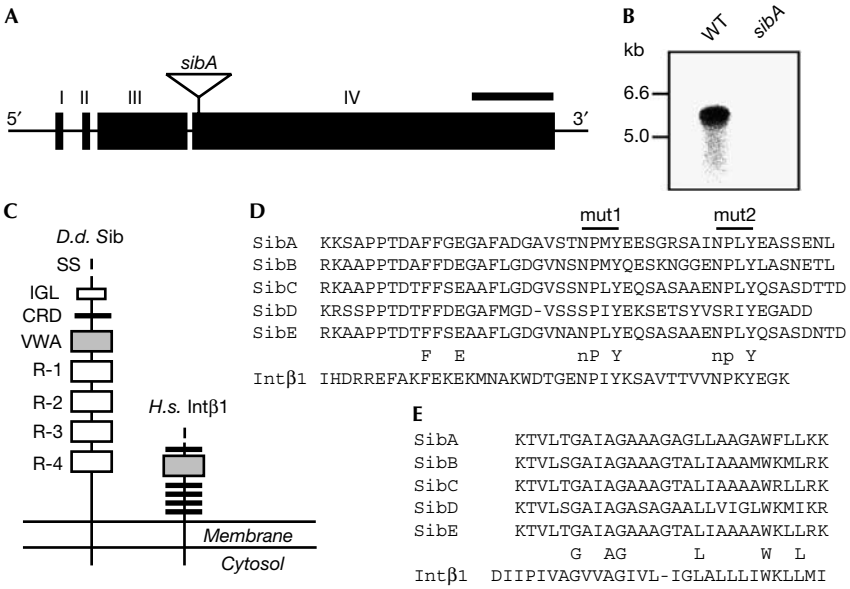


Fig 1 | Structure of Sib proteins. (**A**) Organization of the *SIBA* gene. Exons are shown as numbered black boxes (I–IV). The position of the vector insertion site in *sibA* mutant cells is indicated (nucleotide 1235 of the coding sequence). Scale bar, 1 kb. (**B**) A 6-kb *SIBA* transcript was detected by northern blot in wild-type (WT) but not in *sibA* mutant cells. (**C**) Structure of the SibA protein, and of human integrin β. CRD, cystein-rich domain; *D.d.*, *Dictyostelium discoideum; H.s.*, *Homo sapiens*; IGL, immunoglobulin-like fold; R, repeated motif; SS, cleavable signal sequence; VWA, von Willebrand factor type A domain. (**D**) The cytoplasmic domain of Sib proteins contains a conserved motif also found in integrin β chains. (**E**) The transmembrane domain of Sib proteins contains a GxxxG motif also present in integrin β chains.

confirmed that SibA is present at the cell surface (Fig 2A). Four genes encoding homologues of SibA are present in the *Dictyostelium* genome (DDB0187821, DDB0187822, DDB0219318, DDB0187788), and positioned, like *SIBA*, on chromosome V. The first three are adjacent and arranged in tandem, and the fourth is in close proximity, suggesting a recent expansion of this gene family. Consistent with this hypothesis, the overall structure of Sib proteins is almost identical.

The extracellular domains of Sib proteins contain an immunoglobulin-like fold (E-set, CL-0159, positions 174–235), a cysteine-rich domain (positions 394–461) and a von Willebrand factor type A domain (VWA, positions 520–691; Fig 1C). These three domains are commonly found in the extracellular domains of secreted or membrane-bound proteins and in many instances have been implicated in cell–substrate adhesion. VWA domains are ubiquitous in cytoplasmic proteins, but are also specifically deployed in several metazoan extracellular proteins, with integrin β subunits as very early evolutionary representatives (Whittaker & Hynes, 2002). Although lacking several features characteristic of metazoan integrin β chains, the Sib VWA domains show particularly high homology to integrin β VWA domains (supplementary information 1 online).

In addition, Sib extracellular domains contain four repeats of about 200 amino-acid residues (R1–R4; Fig 1C; supplementary Fig S2 online) also found in several surface or secreted bacterial proteins, in particular VCBS (IPR010221) and RTX (Lally *et al*, 1999) proteins. These bacterial proteins are involved in the interaction of bacteria with their substrate or with host cells, suggesting that these repeats could have a role in binding to certain substrates. We could not detect similar repeats in any eukaryotic protein other than *Dictyostelium* Sib proteins. Sib proteins thus represent hybrid structures associating bacterial-like repeats and metazoan-like features (an extracellular VWA domain), suggesting that these bacterial repeats might have been acquired from bacterial genomes by horizontal transfer.

The Sib transmembrane and cytosolic domains are particularly conserved among Sib proteins. The transmembrane domain is unusually rich in glycine residues, forming notably a GxxxG motif (Fig 1E). A GxxxG membrane motif is important for the oligomerization of several homo- and hetero-oligomeric membrane complexes (Cosson & Bonifacino, 1992; Russ & Engelman, 2000) and is a key feature of integrins' structure (Schneider & Engelman, 2004). The cytosolic domain contains two highly conserved NPxY motifs separated by eight amino-acid residues (Fig 1D), a motif also found in integrin β chains.

The cytosolic domain of Sib proteins interacts with talin

The conserved cytoplasmic domain of integrin β chains mediates interactions with several cytosolic proteins. One of these, talin, has a crucial role in integrin-mediated adhesion (Calderwood, 2004). However, integrin β cytosolic domains contain a tryptophan residue crucial for this interaction, which is not conserved in Sib proteins. To test the ability of the SibA cytosolic domain to interact with talin, we expressed a fusion protein of glutathione *S*-transferase (GST) with the cytosolic domain of SibA in bacteria, purified it and immobilized it on Sepharose beads and then incubated the beads with a *Dictyostelium* cellular lysate. Talin bound to GST–SibA, but not to GST alone (Fig 2B). As expected, no signal was detected when a lysate from *talin* knockout cells was used. In addition, talin also bound to GST–SibB, GST–SibC,

©2006 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

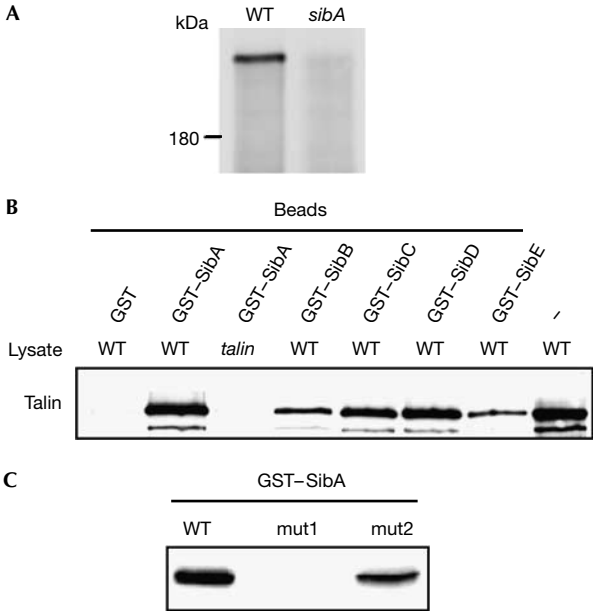


Fig 2 | Interaction of SibA with talin. (**A**) SibA is localized at the cell surface. The cell surface of wild-type (WT) and *sibA* cells was biotinylated. Biotinylated SibA was immunoprecipitated and then observed with avidin–horseradish peroxidase. (**B**) Fusion proteins of glutathione *S*-transferase (GST) with the cytosolic domain of each Sib protein were produced in bacteria, purified and immobilized on beads. The beads were incubated with *Dictyostelium* cell lysates, washed and the bound talin was shown by immunoblotting. A lysate from *talin* mutant cells was used as a control (third lane). The *Dictyostelium* lysate loaded on the gel (right lane) corresponds to 10% of the amount of lysate incubated with each GST fusion protein. (**C**) Mutating the membrane-proximal NPxY SibA motif (mut1; see Fig 1D) abolished the interaction with talin.

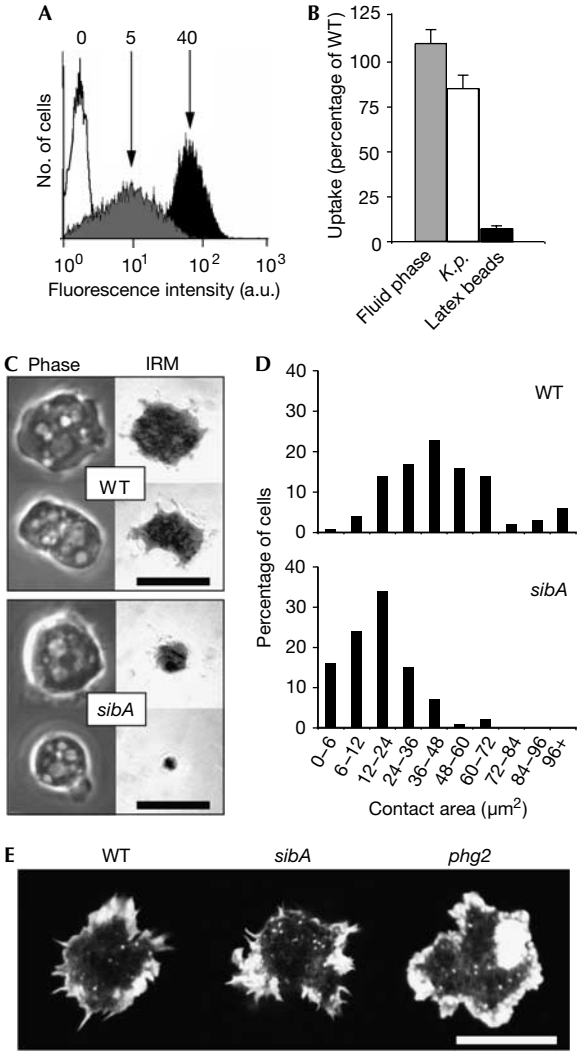


Fig 3 | *sibA* mutant cells show specific adhesion defects. (**A**) *sibA* mutant cells phagocytose latex beads poorly. Wild-type (WT, black curve) or *sibA* cells (grey curve) were incubated for 20 min in the presence (or absence: white curve) of fluorescent latex beads. The amount of internalized fluorescence was determined with a fluorescence-activated cell sorter. The average number of beads incorporated per cell is indicated above each curve. (**B**) Cells were incubated with fluorescent latex beads, *Klebsiella* bacteria (*K.p.*) or dextran for 20 min. The internalization in *sibA* cells is expressed as a percentage of WT internalization. The mean and s.e.m. of at least five experiments are indicated. (**C**) The attachment of *sibA* mutant cells to a glass substrate is defective. WT and *sibA* cells attached to glass coverslips were observed by phase-contrast microscopy (Phase) and by IRM (interference reflection microscopy). (**D**) The areas of 100 individual cells in contact with the coverslip were measured. (**E**) The actin cytoskeleton is unaffected in *sibA* cells. WT, *sibA* or *phg2* cells were fixed and stained with phalloidin. As described (Gebbie *et al*, 2004), abnormal actin aggregates form in *phg2* mutant cells. Scale bar, 10 μm.

GST–SibD and GST–SibE (Fig 2). Mutational analysis showed that the membrane-proximal NPxY motif (mutated in mut1) is essential for binding to talin, whereas the membrane-distal motif (mut2) is dispensable (Fig 2C). A similar finding was previously reported for integrin β chains (Calderwood, 2004).

Cellular adhesion of *sibA* mutant cells is defective

In several phagocytosis mutants characterized so far (Fey *et al*, 2002; Gebbie *et al*, 2004), the phagocytosis defect is caused by a defect in cellular adhesion to particles. For *sibA* mutant cells, phagocytosis of latex beads was altered (Fig 3A), but macropinocytosis, which was determined by measuring the uptake of fluid phase, was unaffected (Fig 3B). In addition, *sibA* mutant cells phagocytosed *Klebsiella* bacteria almost normally (Fig 3B), indicating that the machinery responsible for engulfment of particles was still functional and suggesting that the primary cause of the phagocytosis defect in *sibA* cells might be a specific defect in cell adhesion. To confirm this hypothesis, we measured the ability of *sibA* cells to establish a tight contact with their substrate. Cells were incubated on a glass substrate, and their zone of contact with the glass was visualized and measured by interference reflection microscopy (IRM; Fig 3C). The contact area was markedly smaller for *sibA* cells (average 14 μm^2) than for wild-type cells (41 μm^2; Fig 3D), suggesting that *sibA* mutant cells adhered less readily to their substrate.

©2006 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

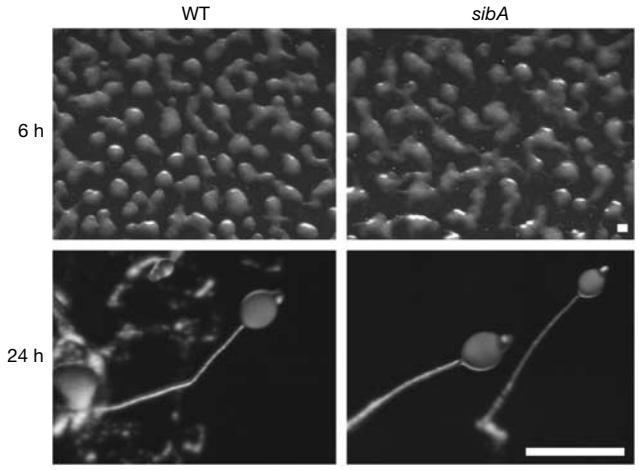


Fig 4 | Development of *sibA* mutant cells is normal. Wild-type (WT) or *sibA* cells were starved to induce development. Cellular aggregates were observed after 6 h and fruiting bodies after 24 h. Scale bar, 0.5 mm.

We then directly measured the adhesion of mutant cells to their substrate. Cells attached to a glass substrate were subjected to a flow of medium, and the speed of the flow necessary to detach 50% of the cells was determined. The strength necessary to detach the cells can be extrapolated and represents the strength of the cellular adhesion to the substrate (Decave *et al*, 2002). The adhesion of *sibA* mutant cells (0.1 ± 0.05 Pa) was significantly weaker than that of wild-type cells (0.6 ± 0.05 Pa), indicating that SibA is necessary for efficient cell–substrate adhesion.

Defects in cellular adhesion can be associated with alterations of the actin cytoskeleton, resulting in a range of anomalies in cell shape and migration, or in cytokinesis (Gebbie *et al*, 2004). No alteration in the organization of the cytoskeleton was seen in *sibA* cells (Fig 3E). Motility of *sibA* cells (2.7 ± 0.2 μm/min) was also identical to that of wild-type cells (3.1 ± 0.2 μm/min). Finally, only a small proportion of *sibA* cells were multinucleate (5.9 ± 0.4%), indicating that there was no significant defect in cytokinesis. Thus, besides their defect in cellular adhesion, *sibA* mutant cells did not show any important alteration in the organization and function of the actin cytoskeleton.

Social amoebae, such as *Dictyostelium*, undergo multicellular development in nutrient-free medium. Here, we observed that *sibA* mutant cells undergo normal development, with the formation of tight aggregates after 6 h of starvation, and of fruiting bodies after 24 h (Fig 4). This indicates that SibA does not have an essential role in the cell-to-cell interactions that allow multicellular development. Analysis of messenger RNA levels by real-time PCR indicated that SibA, SibB, SibC and SibE are expressed in vegetative as well as in starved cells (S.C., unpublished data), suggesting that for certain cellular processes SibB, SibC and SibE may compensate for the lack of SibA.

Similarity between β integrins and Sib proteins

In summary, several features found in *Dictyostelium* Sib proteins are also present in metazoan integrin β chains. First, like integrin β chains, the extracellular domains of Sib proteins contain a VWA domain. Second, the transmembrane and cytosolic domains of Sib proteins are very similar to those found in integrin β chains. In metazoan proteins, this specific configuration (a transmembrane domain containing a GxxxG motif and two conserved cytosolic NPxY motifs) is present only in integrin β chains. Third, like integrin β chains, the cytosolic domain of Sib proteins binds to talin. Finally, loss of SibA causes a specific alteration in cellular adhesion.

There are, however, clear differences between Sib proteins and metazoan β integrins: several domains typical of metazoan integrins are not found in Sib proteins (Psi domain, repeated EGF-like cystein-rich domains), and we have not identified a Sib-associated subunit that would represent the equivalent of α integrins. Several features found in Sib proteins (for example, Sib bacterial-like repeats) are also absent from β integrins. Thus, a phylogenetic relationship between Sib proteins and β integrins remains highly speculative (see below).

Irrespective of their putative phylogenetic relationship, our observations suggest a certain degree of functional similarity in the way in which integrin β chains and Sib proteins connect the extracellular space with the cytosolic machinery. This reinforces the notion that cellular adhesion mechanisms are similar in *Dictyostelium* and in mammalian cells, and that observations in the *Dictyostelium* model system can be extrapolated meaningfully to mammalian cells. A more detailed analysis of the structure and function of Sib proteins will be necessary to determine further the extent of the similarity between β integrins and Sib proteins.

Speculation

Metazoan integrin β chains and *Dictyostelium* Sib proteins could be the products of convergent evolution. However, in view of the similarities demonstrated in this study, we speculate that they might stem from the same ancestral integrin β-like protein. This ancestral β integrin would represent one of the first evolutionary attempts to use VWA domains in extracellular domains, as proposed previously (Whittaker & Hynes, 2002). This hypothesis would place the appearance of β integrins long before the appearance of Metazoa, as recent analysis of the *Dictyostelium* genome indicated that *Dictyostelium* diverged from the line leading to animals after the plant–animal split, but before the divergence of fungi (Eichinger *et al*, 2005). The higher rate of evolutionary change along the fungal lineage may explain why, so far, no fungal integrin β-related molecules have been identified.

METHODS

Cell culture and mutagenesis. Cells were cultured at 21 °C in HL5 medium (Cornillon *et al*, 1998). To initiate multicellular development, cells were plated on 1% agarose Petri dishes in nutrient-free medium (5 mM Na_2HPO_4, 5 mM KH_2PO_4, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, pH 6.5; Sussman, 1987).

The *sibA* mutant was isolated following a procedure described previously (Cornillon *et al*, 2000). The plasmid rescued from the original mutant was used to inactivate the *SIBA* gene by homologous recombination in a DH1-10 wild-type strain (Caterina *et al*, 1994; Cornillon *et al*, 2000), and these *sibA* knockout cells were used for further characterization. Reverse transcription of RNA from wild-type cells followed by PCR amplification (Access Quick™ RT–PCR system, Promega, Madison, WI, USA) and sequencing showed that the 5′ coding sequence of *SIBA* differed from the coding sequence predicted by

©2006 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

the genome sequencing centre, with two short exons instead of one. For northern blot analysis, a *SIBA* probe was obtained by PCR amplification of the genomic DNA using the primers CCAACTCCAGGTTCATCTGG and GCACCATCAGCAAAAGCTCC. The probe was radiolabelled and northern blot was carried out as described (Cornillon *et al*, 1998). The *SIBA* sequence can be found at www.dictybase.org (DDB0187447). Analysis of protein sequences was carried out with SMART (Schultz *et al*, 1998), Blast (Altschul *et al*, 1990) and MULTALIN (Corpet, 1988) programs.

Cellular assays. Phagocytosis and fluid-phase uptake were measured by incubating cells for 20 min at 21 °C in HL5 containing 0.5-μm-diameter Fluoresbrite YG carboxylate microspheres (Polysciences, Warrington, PA, USA), fluorescently labelled *Klebsiella* (Cornillon *et al*, 2000) or 10 μg/ml Alexa647-labelled dextran (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The internalized fluorescence was measured in a fluorescence-activated cell sorter after two washes with HL5 containing 0.1% sodium azide (Cornillon *et al*, 2000). Velocity measurements and staining of nuclei and of the actin cytoskeleton were also performed as described (Gebbie *et al*, 2004).

To examine cell–substrate adhesion, cells were incubated for 4 h in HL5 on a glass coverslip, then observed by phase-contrast microscopy and IRM (Verschueren, 1985), using an Axiovert 100 M microscope (Carl Zeiss AG) coupled to a Hamamatsu Photonics camera, Openlab 3.0.6 software; contact surfaces were determined using the MetaMorph Offline software.

Biochemical methods. To express GST–Sib fusion proteins, the sequence coding for each Sib cytosolic domain was cloned into the bacterial expression vector pGEX-3X. The expression and purification of GST fusion proteins on glutathione–Sepharose beads was carried out as described (Smith & Johnson, 1988). *D. discoideum* cells (5×10^6) were lysed in 1 ml of PBS containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors (Ravanel *et al*, 2001). Lysates were cleared by centrifugation (15 min, 10,000*g*, 4 °C), and supernatants preincubated twice with glutathione–Sepharose beads before incubation for 16 h at 4 °C with GST fusion proteins immobilized on Sepharose beads. Beads were washed five times in lysis buffer and once in PBS, and bound proteins were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Talin was observed as described (Gebbie *et al*, 2004), with monoclonal anti-talin antibodies (169.477.5; Kreitmeier *et al*, 1995).

To immunoprecipitate surface SibA, 6×10^6 cells were biotinylated, lysed and immunoprecipitated with a rabbit anti-SibA polyclonal antibody raised against the cytoplasmic domain of SibA. Biotinylated SibA was shown with horseradish peroxidase-coupled avidin as described (Ravanel *et al*, 2001).

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (http://www.emboreports.org).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank V. Mercanti and R. Froquet for helpful discussions and for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique and the 3R Foundation (to P.C.); from the Human Frontier Science Program (to S.J.C.); from the Ministère de la Recherche (to S.K.) and the CNRS (to F.B.); and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (to F.L.).

REFERENCES

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215:** 403–410

Bracco E, Pergolizzi B, Peracino B, Ponte E, Balbo A, Mai A, Ceccarelli A, Bozzaro S (2000) Cell–cell signaling and adhesion in phagocytosis and early development of *Dictyostelium*. *Int J Dev Biol* **44:** 733–742

Calderwood DA (2004) Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* **32:** 434–437

Caterina MJ, Milne JL, Devreotes PN (1994) Mutation of the third intracellular loop of the cAMP receptor, cAR1, of *Dictyostelium* yields mutants impaired in multiple signaling pathways. *J Biol Chem* **269:** 1523–1532

Cornillon S, Olie RA, Golstein P (1998) An insertional mutagenesis approach to *Dictyostelium* cell death. *Cell Death Differ* **5:** 416–425

Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, Letourneur F, Bruckert F, Cosson P (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *Dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275:** 34287–34292

Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16:** 10881–10890

Cosson P, Bonifacino JS (1992) Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* **258:** 659–662

Decave E, Garrivier D, Brechet Y, Bruckert F, Fourcade B (2002) Peeling process in living cell movement under shear flow. *Phys Rev Lett* **89:** 108101

Eichinger L *et al* (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435:** 43–57

Fey P, Stephens S, Titus MA, Chisholm RL (2002) SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* **159:** 1109–1119

Gebbie L *et al* (2004) Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* **15:** 3915–3925

Kreitmeier M, Gerisch G, Heizer C, Muller-Taubenberger A (1995) A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol* **129:** 179–188

Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* **7:** 356–361

Ravanel K, de Chassey B, Cornillon S, Benghezal M, Zulianello L, Gebbie L, Letourneur F, Cosson P (2001) Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol* **80:** 754–764

Russ WP, Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix–helix association. *J Mol Biol* **296:** 911–919

Schneider D, Engelman DM (2004) Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J Biol Chem* **279:** 9840–9846

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95:** 5857–5864

Schwartz MA (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* **11:** 466–470

Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* **67:** 31–40

Sussman M (1987) Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol* **28:** 9–29

Verschueren H (1985) Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications. *J Cell Sci* **75:** 279–301

Whittaker CA, Hynes RO (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13:** 3369–3387

©2006 EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

Dictyostelium discoideum spreading on solid substrate: morphology and kinetics

Sebastien Keller[1], Sebastien Fache[1], François Chamaraux[2], Bertrand Fourcade[2], Franz Bruckert[1 3 *]

[1] Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR 5092, CEA, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble, France

[2] Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA , 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble, France

[3] Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, INPGrenoble, 3 parvis Louis Neel, 38016 Grenoble, France

[*] Corresponding author. E-mail: franz.bruckert@inpg.fr

Short title: *Dictyostelium discoideum* spreading

Keywords: *Dictyostelium*, spreading, calcium, RICM

Abstract

We have studied *Dictyostelium discoideum* spreading using Reflection Interference Contrast Microscopy to visualize cell-substrate contact areas. Three main characteristics are revealed: first *Dictyostelium* spreading is anisotropic. Cells polarize very quickly, through a signaling pathway implying PiP3 that may be initiated by the initial contact with the substrate. Second, the kinetics of spreading is globally linear and can accurately be fitted with a simple relationship (Chamaraux et al., 2005). Third, the details of the kinetics show that cells spread intermittently with quasi-periodic activities around 9 sec.

We also consider the role of extracellular calcium concentration on the main characteristics of *Dictyostelium* spreading. Extracellular calcium concentration increases the initial speed of spreading without changing the period of the fluctuations and favors the presence of several simultaneous spreading directions. These mechanisms may partly explain how calcium fluxes enhance *Dictyostelium discoideum* phagocytic efficiency and accelerate the shear stress induced motility of the amoebae in the direction of hydrodynamic flow.

154 words

Introduction

The novel possibility to control cell environment at the micron scale clearly demonstrates that cell morphology depends on the topology of cell-substrate contact zones (Jiang et al., 2005; Thery et al., 2006). It is however not clear, whether a biochemical signal is synthesized at the focal contacts that diffuses throughout the cell or whether mechanoreceptors sense local or global mechanical constraints such as membrane tension. Experimental evidences have been gathered for both mechanisms in different cell types (Balaban et al., 2001; Lee et al., 1994; Riveline et al., 2001) and it is possible that they coexist. Whatever the molecular mechanisms, cell-substrate adhesive contacts are part of a general organizational scheme integrating cytoskeleton dynamics, membrane traffic and organelle and cell division axis positioning (Thery and Bornens, 2006). Therefore the role of cell-substrate adhesive contacts is likely to be crucial in organism development and tissue repair.

Another aspect of cell organization is time. Several molecular clock mechanisms are known, that control circadian rhythms (Meyer-Bernstein and Sehgal, 2001), the cell division cycle (Wittenberg and Reed, 2005), or periodic Ca^{2+} oscillations (Berridge and Galione, 1988). These mechanisms involve an autonomous biochemical process alternating between two states, and external resetting pathways. While observing such signaling, questions arise concerning the synchronization of individual cells in a population. Do cells have common time periods? What sets cell phase? What is the origin of cell-to-cell variability?

We previously reported that applying hydrodynamic shear stresses *to Dictyostelium discoideum* cells triggers active actin cytoskeleton dynamics, resulting in net cell movement, either in the direction or against the flow (Decave et al., 2003; Fache et al., 2005). Furthermore, decomposing amoeboid movement in protrusion and retraction events, we observed that during fast cell motility, quasi-periodic protrusive and retractive activity occurred, with a time period of about 8-12 sec. Periodic variation in cell speed was also observed in other experimental situations or with other cell types (Giannone et al., 2004; Uchida et al., 2003). Since cell volume and plasma membrane area are physiologically limited, gains and losses in cell-substrate contact area are mechanically linked during cell movement. It is not possible to know whether protrusions or retractions are at the origin of this quasi-periodic behavior. In chemotaxing *D. discoideum* cells, cross-correlation analysis

shows that protrusions always precede retractions by about 50 sec (Weber et al., 1995). It is therefore possible that molecular mechanisms of cell protrusion by themselves result in periodic variation of front edge speed, which would in turn transmit a periodic signal controlling rear edge speed.

In order to separate protrusion and retraction activity, we study the temporal and spatial dynamics of *D. discoideum* cell-substrate contact area during spreading. In this work, we show evidence that despite large size shape and speed variability, cells possess common spreading characteristics, supporting the physical model of spreading proposed by Chamaraux et al. (Chamaraux et al., 2005). We also show that protrusion activity indeed exhibits quasi-periodic variations, even in the presence of very low retraction activity, with an average period that is comparable for all cells. We finally study the effect of external calcium on the morphology and kinetics of spreading.

Materials and Methods

Strains and chemicals

Dictyostelium discoideum strains Ax2, and DH1 expressing CRAC-GFP, were grown at 21°C in axenic medium[1] (Watts and Ashworth, 1970) in shaking suspensions at 180 rpm (Ax2) or in Petri dishes (DH1). The mode of culture does not affect spreading kinetics (data not shown). Vegetative cells were harvested during exponential growth phase at a density of 2-4·10^6 cells·ml^{-1}, pelleted by centrifugation (1000 x g, 4°C, 4 min), washed twice in Sörensen phosphate buffer (SB: 2 mM Na_2HPO_4, 14.5 mM KH_2PO_4, 5 µM $CaCl_2$, pH 6.2) and used immediately. When indicated, SB was supplemented with 500 µM $CaCl_2$.

Glass plates or coverslips were cleaned with a ionic detergent, rinsed with ethanol and water and etched for 5 min with 14.5 M NaOH as previously described (Decave et al., 2002). New glass plates or coverslips were used for each experiment.

Cytochalasin A, Latrunculin A, LY294002 and other chemicals were from Sigma (La Verpillière, France).

Cell spreading assay

A Labtek coverslip chamber (Nunc) was filled with 100 µL SB and set on an Olympus IX-71 inverted microscope focused at the glass-liquid interface. Cells were resuspended in 100 µL SB at 10^6 cells·ml^{-1} and introduced in the chamber, where they sedimented slowly. Image-recording was started when the first cell could be seen in the observation field and lasted 5 minutes.

Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) was obtained by selecting the 546nm peak of the episcopic mercury lamp by a combination of interference and blue-green filters and illumination through an episcopic cube. The image of the field diaphragm was used to focus at the glass-liquid interface. Light intensity was reduced with neutral density filters, since high illumination intensities block cell movement. RICM images were recorded at 1 Hz by an intensified cooled CCD video camera (Photonic Science, UK) controlled by Image Pro Plus software (IPP, MediaCybernetics). At the end of the recording, a phase contrast image was taken to localize cell positions and check that they were not aggregated. A background RICM image was also taken in the absence of cells.

[1] The composition of the axenic medium is: 14.3 g/L Oxoid L34 peptone, 7.15 g/L Oxoid L21 Yeast Extract, 50 mM maltose, 4.51 mM Na_2HPO_4, 3.53 mM KH_2PO_4, 0.34 mM dihydrostreptomycine.

Analysis of spreading kinetics

The background image was subtracted from the RICM recording and the resulting images were segmented, using the Image Pro Plus software. This generates a black and white movie showing the changes in contact area with time, where cell-substrate contact areas appear white (pixel value 255) over a dark background (pixel value 0). White areas are quantified and plotted as a function of time, giving the spreading kinetics. Individual spreading kinetics are adjusted by the very general relationship derived by Chamaraux et al. (Chamaraux et al., 2005):

$$A(t) = A_{max} \tanh(\alpha t) \qquad \text{(Eq. 1)}$$

where A_{max} is the maximum cell-substrate contact area, α the inverse of the characteristic spreading time and the initial contact time is set at t = 0. In this model, the initial spreading slope is αA_{max}.

Determination of protrusion and retraction activity

Gain and loss zones are defined as the areas where the pixel value respectively increases from 0 to 255, or decreases from 255 to 0 between two frames. The invariable zone is the cell area where the pixel value stays constant. Mathematically, these areas are obtained by computing at each pixel the following function:

$$F_i = \frac{p_i - p_{i-3}}{6} + 127 + \frac{p_i}{255} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

where p_i is the pixel value in frame i (time t_i). Gained, lost or invariable areas correspond to F_i = 170, 86 or 128 respectively and background to 127. Averaging over three successive frames (from t_i to t_{i-3}) eliminates pixel noise associated with the numerical definition of the contour. Gain and loss growth rates are defined as the cell area gained or lost by unit of time.

$$\left(\frac{dA}{dt}\right)_{gain} = \frac{gained\ area}{t_{i-3} - t_i} \qquad \left(\frac{dA}{dt}\right)_{loss} = \frac{lost\ area}{t_{i-3} - t_i} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

A Visual Basic program was written in Image Pro Plus to perform these operations, generate a colored movie and send the values of the gain and loss growth rates to an Excel datasheet. This program is available upon request.

Determination of protrusion and retraction peak activity

Gain and loss area growth rates are plotted as a function of time. The positions and values of the peaks and valleys are extracted by a difference algorithm. Peaks whose height is

less than 0.6 μm^2/sec over that of a neighbor valley are rejected because the existence of the peak is not significant compared to pixel noise ($\approx$ 0.3 μm^2/sec, estimated from the averaged retraction activity during the first 30 sec of spreading, where no active retraction events are observed). Peaks separated by less than 4 sec are considered as a single peak, since the temporal resolution of the gain and loss analysis is 3 sec. For protrusion activity, the heights of significant peaks and the time intervals between significant adjacent peaks (Δt) are further analyzed. For a given cell, the characteristic period is the mean time interval between successive peaks, T = $<\Delta t>$. For a set of cells, the distribution of time intervals Δt between successive peaks is represented as an histogram and fitted with a Gaussian law (mean μ, variance σ):

$$\text{interval frequency} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[\frac{-(\Delta t - \mu)^2}{2\sigma^2}\right] \qquad \text{(Eq.4)}$$

Statistical analysis of cell protrusive and retractive activity

For each cell i, gain $\left(\frac{dA^i}{dt}\right)_{gain}$ and loss $\left(\frac{dA^i}{dt}\right)_{loss}$ area are normalized to their maximum spreading area A^i_{max}. The underlying hypothesis is that cell dynamics is proportional to cell size. Gain or loss kinetics are then averaged, giving, for N cells, the average protrusion or retraction activity, as shown in Fig. 3B :

$$\text{Average protrusion activity (t)} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{i=N} \frac{1}{A^i_{\max}} \left(\frac{dA^i}{dt}\right)_{gain}(t) \qquad \text{(Eq.5)}$$

In order to better visualize parallel dynamics, the position of the first protrusion peak τ_i is determined and the data are shifted in time so that all first peaks coincide at 5 sec. The phased average protrusion or retraction activity it thus (see Fig. 3C and 4) :

$$\text{Phased average protrusion activity (t)} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{i=N} \frac{1}{A^i_{\max}} \left(\frac{dA^i}{dt}\right)_{gain}[t - (\tau_i - 5)] \qquad \text{(Eq.6)}$$

The average protrusion or retraction activities are integrated over time to give the cumulative average protrusion or retraction activities shown in Fig. 5. The difference between the cumulative average protrusion and retraction activities gives the average spreading kinetics ("difference" curve, Fig. 5), which is fitted with Eq.1.

Spreading directionality

For a given cell, the initial contact point I is the centroid of the initial contact area (A(t = 0)). A cell is considered as fully spread[2] at $t_{max} = 1.5/\alpha$. G is the centroid of the fully spread cell contact area.

The spreading angle is the minimal opening angle of an angular sector, whose tip is set at the initial contact point I, that contains 80% of the fully spread cell contact area. The spreading angle is manually determined and most often parallels cell preferential spreading directions. The spreading angle depends on the percentage of the fully spread cell contact area one wishes to enclose in the angular sector. Selecting 80% allows neglecting minor spreading activities while taking into account the most important ones.

The directionality index is the ratio of IG, the distance covered by the contact area centroid during spreading, and $\sqrt{A(t_{max})}$, a characteristic length of the fully spread cell :

$$\text{Directionality index (DI)} = \frac{IG}{\sqrt{A(t_{max})}} \qquad \text{(Eq.7)}$$

The directionality index is not sensitive to the definition of t_{max}, since distances IG and $\sqrt{A(t_{max})}$ increase in parallel with t_{max}.

Definition and determination of individual pseudopod kinetics

To study spreading directionality, we need to consider the area gained by a cell in different directions. To avoid confusion between global and local events, we chose to keep the general word “protrusion” for the global area gain activity, and to define a “pseudopod” as a zone of increasing area in a particular direction. A pseudopod stops after a certain time, when the area in the concerned direction does not extend anymore.

The outline of a cell is defined as the curve enclosing the fully spread cell contact area. Pseudopod tips correspond to points of maximum negative curvature along the outline. The main preferential spreading directions of a cell are determined by visual inspection. On both sides of a preferential spreading direction, two vertexes are defined as the nearest points of maximum positive curvature along the outline. An area of interest is then defined as a closed polygon that links the initial contact point I to adjacent vertexes and encloses the entire area of the pseudopod of interest. The pseudopod area $A(t_i)$ is the area of the cell contained in the

[2] This time corresponds to a spreading area ≥ 90% of A_{max}

polygon of interest at time $t = t_i$. The area of a given pseudopod is measured as a function of time and the derivative is obtained by a 5-point Savitzky and Golay smoothing filter ((Savitzky and Golay, 1964) and (Steiner et al., 1972)):

$$\left.\frac{dA}{dt}\right|_{pseudopod}(t_i) = \frac{-2A(t_{i-2}) - A(t_{i-1}) + A(t_{i+1}) + 2A(t_{i+2})}{10} \qquad \text{(Eq.8)}$$

This formula filters pseudopod kinetics over 3 sec.

Results

Dynamics of cell-substrate contact areas during spreading and motility

Cells are allowed to sediment in a Labtek coverslip chamber in the presence of 500µM $CaCl_2$ and cell-substrate contact areas are visualized by Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) and monitored at 1 Hz. For each individual cell, recording time starts when the cell first contacts the substrate, corresponding to a visible area of about 2 μm^2. Globally, *Dictyostelium* cells spread fast (1-2 min), in an anisotropic manner. A representative example of cell spreading is shown in Fig.1A and movie 1. For this cell, after the initial contact, cell-substrate contact area mainly increases in a single direction for about 60 sec. Then, a new spreading direction appears, at 90° from the first one, and the cell starts retracting its contact area at the initial contact point. Maximal cell-substrate contact area is reached at 100 sec and from that time on, cell-substrate contact dynamics result in net cell movement.

We first consider spreading kinetics, i.e. the evolution of total cell-substrate contact area A with time t. Binary images of cell-substrate contact area are obtained by segmenting RICM images and are quantified (Fig.1C). A very general expression describing cell spreading has been derived by Chamaraux et al. (Chamaraux et al., 2005) (Eq.1, see Materials and Methods). This equation contains two parameters: A_{max}, the maximal spreading area of the cell on the substrate, and α^{-1}, the characteristic spreading time. This equation was used to fit the spreading kinetics shown in Fig.1C (A_{max} = 201 ± 6 μm^2; α = 0.0115 ± 0.0007 sec^{-1}). The global shape of the spreading kinetics is in good agreement with the model's prediction. However, in details, experimental data sometimes differ significantly from the model curve, exhibiting alternatively faster and slower spreading events (see Fig.1C). In order to better characterize the details of the kinetics, we decompose cell-substrate contact area variations into gain and loss zones (Fache et al. 2005). Protrusion and retraction zones are defined as the area gained or lost over a 3 sec time interval. Fig.1B shows cell contact areas gained during 20 sec intervals. Protrusive and retractive activities (μm^2/sec) for the cell shown in Fig.1A and movie 1 are plotted as a function of time in Fig.1D. As the cell reaches the substrate, only protrusion activity is detectable, and retractions start only at 60 sec. The end of spreading and the transition from spreading to motility corresponds to the moment when protrusion and

retraction curves stabilize around the same mean value. From Fig. 1D, it is obvious that protrusive activity is not steady, but exhibits large peaks. Using the criteria described in Materials and Methods (peak height ≥ 0.6 μm^2/sec, time between peaks ≥ 4 sec), we separate significant peaks from noise. Plotting the time occurrence of successive significant peaks reveals that they appear regularly. For the cell under study, the mean period Δt is about 9.6 seconds (Fig.1E) and depends only weakly on the peak height criterion defined above (data not shown), which supports the significance of the observed regularity.

Cell spreading requires actin cytoskeleton remodeling. This is clearly shown by adding cytochalasin A or latrunculin, drugs that promote actin filament depolymerization. Both drugs strongly decrease the initial spreading slope of *D. discoideum* cells (Fig.2A and B). While 2μM latrunculin strongly inhibits spreading, the same cytochalasin concentration does not affect the spreading slope. 6μM cytochalasin is necessary to inhibit fast spreading. The difference in the efficiency of the two drugs is in good agreement with observations made on other chemotactic cells like neutrophils (Sengupta et al., 2006) and could be explained by an accumulation of latrunculin in cells due to an active sequestering (Pring et al., 2002).

Directionality of cell spreading depends on the formation of a PIP3 gradient

As shown in Fig1A and B, cells do not spread isotropically around the initial contact point. A preferential direction for the extension of cell-substrate contact area arises quickly, after about 10 sec. In chemotaxis, actin polymerization and cell movement are polarized thanks to the formation of a stable PiP3 gradient (Merlot and Firtel, 2003; Parent and Devreotes, 1999). To investigate a similar involvement of PiP3 in cell spreading, we examine DH1 cells expressing CRAC-GFP using fluorescence microscopy. CRAC-GFP labels the PIP3 gradient at the cell front, where pseudopods form. When these cells spread on a surface, a fluorescent front, localized at the spreading side, appears in 85% of the cells (N=25) during the first minute after contact with the substrate (data not shown).

Furthermore, addition of 10 μM LY294002, a drug that inhibits PI3kinase activity, fully prevents both CRAC-GFP front formation and anisotropic spreading. The areas gained during successive 20 sec intervals are shown in Fig.2D for two typical cells, either treated with LY294002 or with the DMSO vehicle only. In the case of the LY294002-treated cell, successive gained areas concentrically surround the initial contact point. However, the initial

spreading slope is not dramatically affected (Fig.2C). At least 30 µM LY294002 is required to significantly inhibit cell spreading. We conclude that PI3kinase activity is involved in *Dictyostelium* fast spreading on solid substrates, and that formation of a PIP3 gradient is induced by cell-substrate contact and sets the direction for initial spreading.

Statistical analysis of pulsatile protrusive activity

Spreading kinetics of individual cells are very diverse. Cells first differ both in the maximum area they have in contact with the substrate (A_{max}), and in their characteristic time of spreading (α^{-1}). In addition, while some cells have rather smooth spreading kinetics, others clearly spread in distinct steps (Chamaraux et al., 2005). In fact, a closer look reveals that even apparently smooth kinetics consist of several phases of alternating faster and slower spreading rates, as already described in Fig. 1. Other representative examples are provided in Supplementary Material.

For a better statistical evaluation, we studied a set of 15 cells spreading on a glass surface in the presence of 500 µM $CaCl_2$. To detect significant peaks of protrusive activity, we set a threshold value at twice the value of the noise in protrusion activity, namely 0.6 $\mu m^2.sec^{-1}$. With the criteria explained in Material and Methods, peaks are detected and the time intervals between adjacent peaks Δt are calculated. At the level of the entire cell population, Δt time intervals distribute over a broad peak, of mean 8.9 sec and standard deviation 4.1 sec. For a given cell, a characteristic period T is determined by averaging Δt. This period does not significantly vary from cell to cell ($<T> = 8.9 \pm 1.6$ sec), which shows that most variation indeed originates from intrinsic fluctuation of cell activity. The distribution of Δt time intervals is well represented by a Gaussian distribution of mean $\mu = 6.2 \pm 0.7$ sec and variance $\sigma = 4.2 \pm 0.6$ sec (Fig.3A) and does not depend on the threshold value used to define significant protrusion peaks. When the threshold is increased to 0.9 $\mu m^2.sec^{-1}$, the parameters of the Gaussian distribution slightly changes : $\mu = 6.8 \pm 0.8$ sec and $\sigma = 4.7 \pm 0.8$ sec. When it is decreased to 0.3 $\mu m^2.sec^{-1}$, more small peaks are incorporated, thinning the distribution : $\mu = 7.1 \pm 0.2$ sec and $\sigma = 2.7 \pm 0.3$ sec. The threshold value retained to define significant peaks makes it therefore possible, that some intervening peaks are not detected, shifting the apparent characteristic period Δt upward. Nevertheless, we conclude that significant protrusive activity occurs regularly, with a roughly 9 sec recurrence time period.

As for retractions, with the same criteria, it is not possible to determined a significant periodic activity on the existing data.

We then average individual gain and loss kinetics after normalization to the maximum contact area A_{max} (Fig.3B). We first observe that the average protrusion activity decreases and the average retraction activity increases along spreading, until they reach the same steady-state level. Furthermore, oscillations in protrusion activity are clearly visible. The presence of oscillations in average protrusive kinetics reveals that the peaks evidenced before in individual cells partly superimpose. This suggests that the onset of the periodic protrusive activity coincide with the initiation of spreading. Indeed, the first maximum in the protrusion curve indeed does not appear randomly, but occurs within 5,2 ± 2,2 sec upon cell-substrate contact. Therefore, the contact with the substrate may trigger the first protrusion peak.

The uncertainty in the position of the first peak is due to the difficulty to detect the initial contact of the cell with the substrate, since it corresponds to very small areas. This uncertainty generates phase differences between cells that may mask their common behavior. In order to phase cell contributions together, we therefore shift individual cell protrusion kinetics along time so that the first maximum occurs at 5 sec. This phasing procedure clearly increases the size of the oscillations seen on average protrusion kinetics (Fig. 3C), supporting the existence of a common synchronal 9 sec period.

The existence of a pulsatile protrusive activity is not affected by the addition of 10µM LY294002. As this concentration fully inhibits the formation of a PIP_3 gradient, as described above, we can conclude that the pulsatile protrusive activity observed does not result from variations in PIP_3 concentration.

Fluctuations in protrusive activity are also seen in the presence of 1µM latrunculine. Interestingly, the mean time separating adjacent peaks is slightly increased under these two conditions (11.5 sec in both cases). The parameters of the Gaussian law fitting the experimental data are indeed modified : $\mu = 9.1 \pm 0.9$ sec and $\sigma = 5.7 \pm 1$ sec in the presence of 1µM latrunculine and $\mu = 7.8 \pm 1.2$ sec and $\sigma = 6.0 \pm 1.1$ sec in the presence of 10µM LY294002. This shift is not due to the 30% decrease in spreading rate, since parameters of the Δt distribution are not sensitive to a 30% variation in the threshold used to define significant protrusive activity. The activity of the proteins inhibited by these drugs therefore influences the common time period of the cells. At higher drug concentrations, all significant fluctuations disappear and the cells spread slowly and smoothly.

Calcium stimulates protrusive activity without changing the characteristic period.

We previously reported that external calcium concentration and calcium release from internal stores modulates cell velocity in response to hydrodynamic shear stress (Fache et al., 2005). Since both protrusions and retractions are involved, motility experiments could not distinguish which process is stimulated by calcium fluxes. We thus compare spreading kinetics recorded at 5 μM and 500 μM calcium, obtained on the same day with the same cell suspension. This experiment was reproduced several times with similar results. Kinetics are averaged over all renormalized recordings (Fig.4 and 5).

Reduction of the external calcium concentration does not significantly change the distribution of time intervals between successive peaks of protrusion activity (Δt, μ and σ, see Table 1), but two important features are changed.

First, for a given cell, the occurrence of peaks of protrusive activity is less regular at 5μM calcium concentration. This explains that periodic activity is less visible on average protrusion kinetics (Fig.4C). The time of occurrence of the first peak is also much more variable. In 14% of observed cells, initial contact triggers fast spreading ($(dA/dt)/A_{max} > 0.03$ sec^{-1}) after a delay longer than 10 sec. This never happens in the presence of 500 μM Ca^{2+}. When cell protrusive activity is synchronized on the first peak, the first two peaks are well defined, but the following ones are noisy (Fig.4C).

Second, the initial level of protrusion activity is higher at 500μM Ca^{2+} than at 5μM Ca^{2+}. Furthermore, this level decreases with spreading at 500μM Ca^{2+}, whereas it stays relatively constant at 5μM Ca^{2+}, resulting in comparable protrusive activities at the end of spreading (see Fig 4.A and C, and Table 1). Integrating protrusion and retraction kinetics with time confirms this observation and allows quantifying these activities (Fig. 5A and C). In the presence of 5μM Ca^{2+} (Fig. 5C and D), the protrusion slope changes only from 0.015 sec^{-1} during the initial 0-40 sec time interval to 0.011 sec^{-1} during steady state (60-120 sec). Meanwhile the protrusion rate in presence of 500μM Ca^{2+} decreases from 0.024 sec^{-1} (0-40sec) to 0.012 sec^{-1} (60-120 sec). In contrast, neither the steady state retraction rate nor the onset time of retraction activity, obtained by linear extrapolation of the steady state retraction rate, depend on the extracellular calcium concentration (Table 1).

As a consequence, cells spread more slowly in the presence of 5 μM Ca^{2+}. The difference between integrated protrusion and retraction activities gives the average spreading kinetics ("difference", Fig5). This curve is well fitted by Eq.1. The average spreading rate $\bar{\alpha}$ is

significantly different at high and low calcium concentrations : $\bar{\alpha} = 0.027\ s^{-1}$ and $0.016\ s^{-1}$ in the presence of 500µM or 5 µM Ca^{2+} , respectively (Table 1).

We thus conclude that calcium stimulates protrusion activity immediately after contact with the substrate, and facilitates the onset of fast cell spreading. External calcium does not play any role in the level of retraction activity during spreading and spontaneous motility.

The cell periodic protrusion activity does not require retraction activity

Retractions start about 30-40 sec after the beginning of cell spreading, which suggests that retractions do not play any role in the genesis of protrusion oscillations. To better study the relationship between protrusion and retraction activities, we study cell spreading on a more adhesive substrate, which makes retractions more difficult.

Decavé et al. showed that APS-treated glass is three times more adhesive than plain glass for *D. discoideum* cells (Decave et al., 2002). The detachment rate of cells submitted to hydrodynamic shear stress is strongly decreased on this substrate. We study cell spreading on APS-treated glass in the presence of 5 or 500 µM Ca^{2+}. Qualitatively, cells behave in the same manner on this substrate as they do on plain glass, exhibiting a periodic protrusion activity rapidly triggered after contact, and a slow increase of retraction activity. Quantitatively, the distribution of time intervals between successive protrusion peaks is not significantly different from the one reported before for plain glass (Table 1). However, retraction activity is reduced by a factor of two, independently of the calcium concentration, during both spreading and motility (steady state retraction activity = 0.0066 sec^{-1}, Fig.5B and D). During the initial phase of spreading (0-40 sec) on APS-treated glass, protrusion activity is nevertheless comparable to that observed for cell spreading on plain glass. During the steady state (60-120 sec), protrusion activity adapts to the lower retraction activity, resulting in slower net cell motility after spreading (data not shown). Parameters of cell spreading are given in Table 1. Average spreading kinetics, obtained by subtracting the retraction from the protrusion activity, are quite comparable to those measured on plain glass (Fig5.B and D and Table 1).

This result confirms that the onset of periodic protrusive activity is independent of the retraction rate. However, protrusive activity adapts its level to the average level of retractions.

Spreading rate and directionality are interdependent in the presence of extracellular calcium.

Despite the common 8-10 sec period activity, individual cells exhibit large variations in their individual kinetic parameters α and A_{max} (Table 1 and Supplementary Material). In this part, we try to understand the origin of cell-to-cell variability. Parameters α and A_{max} are statistically independent (data not shown), which suggests that spreading is not kinetically limited by the diffusion of some molecule within the cell[3]. Furthermore, cells present large variations in their morphology during spreading. We therefore investigate the possible relationship between cell shape and spreading kinetics.

During spreading, cells extend protrusions in one or several different main directions, which gives rise to extended or globular cell shapes. In the following, we designate "pseudopod" a zone of continuous increasing area in a particular direction. To describe cell morphologies, we also define a representative angle parameter θ, called the spreading angle, which is given by the angular sector issued from the initial contact point and containing 80% of the total spreading area. Limiting the angular sector to this fraction of the area ensures that directions corresponding to minor spreading activities are neglected (see Fig 6.A for three representative examples). Figure 6C shows that for cells spreading in the presence of 500µM extracellular calcium, the spreading rate α tends to increase with the spreading angle θ. On the contrary, at low calcium concentration (5µM), these two parameters are statistically independent.

The spreading angle we defined obviously depends on the fraction of the total area we wish to include in the cone of spreading. So, a directionality index is defined, which takes into account the full cell area (see Materials and Methods). Briefly, this index is the ratio of the distance between the initial contact point and the center of mass of the fully spread cell, divided by a characteristic length of the cell, namely the square root of A_{max} (Eq.7).

[3] If spreading kinetics were limited by diffusion, a linear relationship would be expected between A_{max} and α^{-1} : $D = \alpha A_{max}$ being the diffusion coefficient.

The spreading angle θ decreases when the directionality index increases (Fig. 6D), justifying the definition given to this parameter. Fig. 6E shows that in the presence of calcium, the spreading rate α decreases as the directionality index increases. In the absence of calcium, the spreading rate is not linked to the directionality index. In all cases, the presence of calcium enhances the spreading rate. The effect is however more pronounced when the cells have several preferential spreading directions, resulting in a large θ. In order to understand how calcium accelerates spreading, we specifically consider such cells. We examine the position of areas gained by cells spreading at high or low calcium concentrations during given time intervals (see cell a and c in Fig.6A). We decompose spreading into the four indicated preferential directions indicated as 1 to 4 and calculate the growth rate of each pseudopod (Fig.6B). At low calcium concentration (cell c), cells exhibit only one preferential direction at a time: pseudopod 3 appears first (peak at t = 5 sec), then pseudopod 2 (t= 11 sec) and pseudopod 1 (t = 15 sec). After a while, pseudopod 3 restarts growing (t = 42 and 50 sec) followed by pseudopod 4 (t = 47 sec and 54 sec). Pseudopod activity superimposes only during the interval 15-35 sec. At high calcium concentration however (cell a), several protrusions simultaneously grow: pseudopods 2, 3 4 start together (peaks at t = 8, 9, 8 sec, respectively), then have parallel activity during one period (t = 17, 15, 16 sec respectively), pseudopod 4 then stops expanding while pseudopod 1 starts (t = 20 sec), in phase with pseudopods 2 and 3 (t = 21 and 19 sec). During the entire spreading time (t_{max} = 25 sec), this cell thus has three active pseudopods at the same time. Note that the growth rate of each pseudopod is roughly independent of the external calcium concentration. We conclude that in the presence of high calcium concentration, cells are able to emit several pseudopods at the same time during spreading. These observations are confirmed by the examination of other cells (data not shown).

Discussion

In this work, we analyze the general character and cell-to-cell variations of *Dictyostelium discoideum* spreading on solid surfaces. Cells have various forms, elongated or more rounded, spread faster or slower, and reach different total areas (Fig.6, see also Supplementary Material).

Despite these large cell-to-cell variations, the dynamics of cell-substrate contact areas during spreading of *Dictyostelium discoideum* reveal common features: a few seconds after contact with the substrate, cells start to extend pseudopods in one or several directions. A succession of pseudopods follows, resulting in an anisotropic increase in cell-substrate contact area. After about one minute, the cell starts retracting part of its contact area. At this point, pseudopods still extend but their growth rate decreases to match the retraction activity. Once a balance between gain and loss of area is reached, spreading is completed and cells start to move on the surface, with variation in their contact area under 30%.

D. discoideum spreading kinetics consists of discrete steps and obey a globally linear function

Spreading kinetics (total contact area as a function of time) is a biphasic curve: a quasi-linear increase is followed by a plateau. The experimental data are well fitted by Eq.1, derived from the model developed by Chamaraux et al (Chamaraux et al., 2005). Briefly, the hypothesis underlying this model is the control of actin polymerization, motor of cell spreading, by two antagonist processes: i) stimulation of actin polymerization through a cell-substrate contact-induced signaling. ii) initiation of actin depolymerization by membrane tension, which increases with the contact area. Our data confirms the fundamental role of actin polymerization in cell spreading. Furthermore, the initiation of retractions at the end of spreading and the inhibiting effect of retractions on the protrusion activity suggests that membrane tension may indeed be important in the control of cell spreading.

Evidence for the effect of membrane tension on cell edge dynamics have been provided by addition of amphiphilic compounds (Raucher and Sheetz, 2000). In addition, it has been shown that an applied hydrodynamic shear stress facilitates retraction of the upstream side by a peeling mechanism (Decave et al., 2002) and decreases membrane tension at the downstream side (Simson et al., 1998), resulting in a rapid movement in the direction of the flow. This supports a role for membrane tension in regulating cell edge movement.

Chamaraux's model however presents limits when compared to experimental data: first of all, superimposed on their global linear increase, spreading kinetics of individual cells present temporal rate variations well above experimental uncertainty, which cannot be explained by this simple model. Second, it does not take into account the existence of preferential spreading directions, although it is not incompatible with their existence (Ali et al. manuscript in preparation). Note that the general relationship linking the movement of cell margin and membrane tension derived by Chamaraux et al. does not depend on the molecular details of actin driven protrusions or myosin II mediated retractions. Therefore this model is equally suitable to describe the spreading of motile (where protrusion and retraction activities tend to a common non zero value) and non-motile cells (absence of retraction, the protrusion activity tends to zero). This justifies the use and explains the excellent agreement of the theoretical curve with the experimental data, once cell-specific fluctuations are removed by the averaging procedure used in Fig. 4 and 5.

Comparing the spreading of *D. discoideum* with other cells previously described, like endothelial cells (Reinhart-King et al., 2005), fibroblasts (Dobereiner et al., 2004) monocytes (Pierres et al., 2003) or neutrophils (Sengupta et al., 2006), shows interesting characteristics. Despite a large variability in experimental conditions and spreading parameters (spreading time up to several hours for fibroblasts), all studies show several phases in spreading kinetics and in particular a common phase of quasi-linear growth responsible for most of the increase in total spreading area. This linear growth could thus be a universal characteristic of cell spreading, as proposed by Cuvelier et al. (Cuvelier et al., 2007). The authors present an alternative model accounting for the linear rate of spreading. In this model, spreading is considered as a passive phenomenon, whose kinetics are driven by a gain of adhesion energy while the contact area increases and limited by dissipation of energy due to the deformation of the actin cortex, considered as a viscous fluid. The model does not describe the end of spreading and the possible transition to motility. Furthermore, considering the actin cortex as a viscous fluid is incompatible with the directional spreading we observe. This explains why we preferentially refer to Chamaraux's model to represent our experimental data.

Remarkably, cells exhibiting the closest behavior compared to *D. discoideum* cells are neutrophils, with a relatively short spreading time (about 5 min) and a polarized spreading behaviour (Sengupta et al., 2006). Interestingly, both cell types are professional phagocytes, and mechanisms involved in spreading, such as contact with a surface, adhesion and

extension of directional pseudopods, are likely to be important for phagocytosis. Studying the spreading of mutant cells deficient in phagocytosis could therefore be helpful to characterize the function of key proteins. Interestingly, Cornillon et al. reported that invalidation of a D. discoideum gene coding for a protein similar to the β subunit of integrins (SibA) prevents phagocytosis and strongly reduces cell spreading under the same conditions we used in this study (Cornillon et al., 2006). Fast *Dictyostelium* spreading may therefore involve an integrin-like adhesion receptor.

Periodic fluctuations in protrusion activity

A second remarkable result is the presence of almost periodic protrusion activity during *Dictyostelium* spreading and motility. This was first observed during shear flow induced cell motility (Fache et al., 2005), and is confirmed in this study. The reported time period is almost the same in both studies (9 ± 1 sec). It should be noted that the spatial and temporal resolution of our setup limits our studies to events with characteristic times larger than 3 sec. The existence of faster fluctuations in contact area dynamics cannot be excluded. As for retractions, their level is too low to characterize any statistically significant periodic fluctuations.

Individual peaks often –but not always- match changes in cell protrusion direction. This is especially obvious for cells extending successive protrusions in different direction such as cell c shown in Fig. 6A and B. Since peaks correspond to protrusive activity localized at different place in the cell, the global organization of the actin cytoskeleton necessary for cell motility is subjected to this 9-sec periodic activity. The 9-sec time period evidenced in this work is not the only characteristic time describing cell activity. Protrusion activity peaks are indeed often grouped into clusters, corresponding to discrete rise of activity observed during spreading and motility (Shenderov and Sheetz, 1997).

The origin of this 9-sec time period remains mysterious. Within our experimental limits, it is independent of cell morphology, substrate adhesiveness and a 100-fold change in extracellular calcium concentration. A calcium oscillator is therefore very unlikely to be

involved. Since oscillations are observed from the beginning of spreading, and last during the motility phase, it is unlikely that they are due to periodic increases in membrane tension. Two observations give some clues about its origin. First, the periodic activity seems to be set by the contact with the substrate, at least in the presence of 500 µM calcium concentration. Second, it is slightly slowed down when actin polymerization is partly inhibited. It is therefore possible that the intermittent movement of the cell margin corresponds to activation and desactivation of adhesion receptors controlling local actin polymerization. Actin polymerization at the cell margin would in return trigger adhesion receptor activation, starting a new cycle. Lowering the actin polymerization rate would thus extend the duration of this cycle.

Extracellular calcium stimulates spreading by allowing several protrusions to rise and grow simultaneously

Raising the calcium concentration hundred-fold increases the initial rate of protrusion activity 1.6-fold (Fig.5), but does neither change the rate of retraction activity, nor modify the frequency of protrusion fluctuations. In addition, the amount of cytochalasin required to fully inhibit spreading is 2-fold larger at 500 µM than at 5 µM calcium concentration (data not shown). This suggests that in the presence of high calcium concentration, more actin filament barbed ends are present, resulting in an increase in protrusion activity. However, this does not mean that protrusion activity intrinsically increases, since calcium affects the spreading rate α in a manner that depends on spreading directionality. At a high spreading directionality index, when protrusions mainly extend in a single direction, cells indeed spread slightly faster at 500 µM than at 5 µM calcium concentration. In contrast, at a low spreading directionality index, when protrusions extend in several directions, cells spread 3 to 5 times faster at high calcium (Fig. 6E). As exemplified on Fig. 6B, this faster rate is explained by the presence of simultaneous pseudopods, whose contributions sum and speed up spreading. Thus, the average activity of individual pseudopods does not change with the external calcium concentration, but the probability is higher for two or more pseudopods to grow simultaneously and not successively.

During chemotaxis, the activity of enzymes such as PTEN or RegA phosphatases and Adenylyl Cyclase acaA help maintain the PIP3 gradient within the cell and prevent the appearance of lateral pseudopods (Stepanovic et al., 2005; Wessels et al., 2007; Wessels et al., 2000). This inhibitory signaling pathway is triggered at the front side of the motile cell upon

activation of cAMP receptors. We similarly propose that adhesion-triggered pseudopods also involve an inhibitory signal preventing the appearance of lateral protrusions. Extracellular calcium would decrease this signal, allowing simultaneous pseudopods to rise and grow. This higher protrusion activity explains how calcium mobilization enhances phagocytosis by accelerating irreversible capture of preys (Fajardo et al., 2004).

Fache et al. reported that raising extracellular calcium concentration up to 500 µM increases shear-flow induced cell motility 5 fold (Fache et al., 2005). Under these conditions, calcium addition does not change the period of protrusion and retraction activity, but increase their size (the area gained or lost during a single time period). During spreading, calcium addition has a significantly lower effect on the level of protrusion activity (1.6 fold stimulation), and none on retraction activity. Simultaneous pseudopod growth in the presence of calcium is therefore insufficient to solely account for the increase in cell motility under shear stress.

In conclusion, this work shed light on both the common and variable parts of *Dictyostelium* spreading on solid surfaces. Furthermore, in the presence of high calcium concentration, a connection seems to exist between the temporal and spatial controls of cell spreading. This relationship needs to be further studied combining microengineered adhesion patterns, visualization of important actin cytoskeleton proteins and gain and loss analysis of cell-surface contact areas.

Legends to Table 1

Table 1: Experimental parameters describing cell spreading

N: number of cells studied

Spreading kinetics parameters:

A_{max}: maximum cell-substrate contact area averaged over N cells (mean ± standard deviation (s.d))

α: spreading rate averaged over N cells (mean ± s.d)

Parameters of the distribution of time intervals between protrusion peaks:

$<\Delta t>$: average time interval (mean ± s.d / $\sqrt{N}$)

μ: mean of the Gaussian fit (best value ± fit error)

σ: variance of the Gaussian fit (best value ± fit error)

Parameters of the average cumulative protrusion and retraction activities ($(dA/dt)/A_{max}$ in sec^{-1}) and of the average spreading kinetics after renormalizing the area to A_{max}.

protrusion (1-40 sec) : slope over the first 40 sec (error < 0.0002 sec^{-1})

protrusion (60-120 sec) : slope between 60 and 120 sec (error < 0.0002 sec^{-1})

retraction (60-120 sec) : slope between 60 and 120 sec (error < 0.0002 sec^{-1})

onset time of retraction: predicted by extrapolation of the steady state retraction slope

$\bar{\alpha}$: spreading rate determined by fitting the difference curve (Fig. 5) with Eq1 (best value ± fit error)

Best fits and errors on the fitting parameters are determined by least square minimization using Kaleidagraph software.

Table 1

Material	Plain glass		APS-treated glass	
$[Ca^{2+}]$	5μM	500μM	5μM	500μM
N cells	13	19	15	9
A_{max} (μm^2)	184 ± 63	159 ± 35	190 ± 92	170 ± 55
α (sec^{-1})	0.021 ± 0.016	0.028 ± 0.013	0.019 ± 0.006	0.021 ± 0.011
$<\Delta t>$ (sec)	8.5 ± 0.3	8.9 ± 0.3	8.3 ± 0.3	9.6 ± 0.5
μ (sec)	6.2 ± 0.6	6.2 ± 0.7	5.8 ± 0.4	7.2 ± 0.7
σ (sec)	3.9 ± 0.6	4.2 ± 0.6	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.7
protrusion (1-40 sec) (sec^{-1})	0.0151	0.0236	0.0140	0.0231
protrusion (60-120 sec) (sec^{-1})	0.0113	0.0116	0.0085	0.0087
retraction (60-120 sec) (sec^{-1})	0.0098	0.0128	0.0065	0.0067
onset time of retractions (sec)	38 ± 2	40 ± 1	42 ± 1	36 ± 2
$\bar{\alpha}$ (sec^{-1})	0.0158 ± 0.0003	0.027 1± 0.0003	0.0141 ± 0.0001	0.0236 ± 0.0002

Legends to figures

Figure 1 : Representative example of *Dictyostelium* step by step spreading

A. RICM images of a *Dictyostelium* cell spreading on a glass surface in the presence of 500µM $CaCl_2$. After spreading, the cell starts moving in the direction indicated by the arrow (T = 100sec). The asterisk in the first and last frames indicates the initial contact point.

B. Composite picture showing in increasing greyscale the area gained by the cell shown in A during successive 20sec time intervals. The initial contact area appears in white.

C. Spreading kinetics of the cell shown in A: total contact area as a function of time (circles). The solid line is a fit of experimental data with Eq.1.

D. Dynamics of cell-substrate contact areas during spreading of the cell shown in A: gained area (thin line) and lost area (thick line) as a function of time. Arrowheads point to significant protrusion peaks.

E. Time occurrence of successive peaks in the kinetics of gained area shown in D. The distribution can be linearly fitted, defining an average period of 9.6 sec.

Figure 2 : Effect of cytochalasin, latrunculin and LY294002 on *Dictyostelium* spreading

Initial slope of average spreading kinetics as a function of latrunculin (A), cytochalasin (B), or LY294002 (C) concentration. Mean of 5 to 10 cells for each condition.

D Changes of cell spreading morphology upon addition of 10µM LY294002 (LY294002-treated) or 0.3% DMSO (control). Asterisks indicate the initial contact point. Composite pictures show the area gained by the cells during successive 20sec time intervals in increasing greyscale.

Figure 3 : Statistical analysis of cell spreading dynamics

Gain and loss kinetics are recorded for 15 cells spreading on a glass surface in presence of 500µM $CaCl_2$. For each cell, gain and loss activities (dA/dt) are normalized to the maximum spreading area A_{max}.

A. Histogram of time intervals between adjacent peaks of gain activity, as determined in Materials and Methods. The solid line represents the best fit of the experimental data with a normal distribution (see Table1 for parameters).
B. Average of normalized gain (protrusions) and loss (retractions) kinetics.
C. Average of normalized gain and loss kinetics after synchronisation of kinetics on the first peak of gain activity (set at 5 sec). The statistical error is 0.0027 sec^{-1}. The averaged time interval between the 6 first peaks is 9 ± 1.7 sec.

Figure 4: Influence of extracellular calcium concentration and substrate adhesiveness on periodic protrusion activity during spreading

Averaged normalized gain (protrusions) and loss (retractions) kinetics of *D. discoideum* cells spreading on untreated (A,C) or APS-treated (B,D) glass, in the presence of high (500µM, A,B) or low (5µM, C,D) extracellular calcium. Data are synchronised on the first peak as in figure 3C. Arrowheads point to the significant peaks compared to statistical error (0.0027 sec^{-1}) for the first 60 sec of the curves.

Figure 5 : Influence of extracellular calcium concentration and substrate adhesiveness on cumulative protrusion and retraction activities during spreading

Averaged normalized gain (protrusions) and loss (retractions) activities, integrated over time for the cells studied in Figure 4, spreading on untreated (A,C) or APS-treated (B,D) glass, in the presence of high (500µM, A,B) or low (5µM, C,D) extracellular calcium.
The difference between integrated gain and loss activities (difference, circles) corresponds to the average spreading kinetics under the different conditions and is fitted with Eq.1 (difference, thin line). Representative parameters are given in Table 1.

Figure 6 : Calcium relates spreading rate and directionality

The spreading rate α, spreading angle θ and directionality index (DI) are determined for each cell as described in Materials and Methods. Black and white circles correspond to cells spreading in 500µM and 5µM extracellular calcium, respectively. Data corresponding to cells spreading on plain or APS-treated glass are pooled.

A. Representative examples of cells spreading with a large (a, c) or a small (b) spreading angle θ. Composite pictures show the area gained by the cells during successive time intervals (a: 10 sec; b and c : 20 sec), up to maximum spreading. Asterisks indicate the initial contact point.
B. Individual pseudopod kinetics of cell a (left) and cell c (right). Pseudopods 1 to 4 of cell a and 1 to 3 of cell c originate from the initial contact point. The area of interest was designed from this point as explained in Materials and Methods. Pseudopod 4 of cell c originates from the side of pseudopod 1. The area of interest for this pseudopod was thus designed from the centroid of the fully spread pseudopod 1.
C. Spreading rate α versus spreading angle.
D. Spreading angle versus directionality index.
E. Spreading rate α versus directionality index.

Each point represent a single cell.
The representative a, c and b cells are indicated by black and white arrows, respectively.
Cell a is representative for large spreading angle at 500µM $CaCl_2$
Cell b is representative for small spreading angle at 500µM $CaCl_2$
Cell c is representative for large spreading angle at 5µM $CaCl_2$

Movie 1: Representative movie of *Dictyostelium discoideum* spreading

RICM movie of a *Dictyostelium* cell spreading on a glass surface in the presence of 500µM $CaCl_2$. The scale bar corresponds to 5µm.

Supplementary material

Morphology and spreading kinetics of three cells spreading on glass in the presence of 5 μM $CaCl_2$. Asterisks indicate the initial contact point. Individual maximum contact areas A_{max}, and spreading rate α are given in the following table:

cell	1	2	3
Amax (μm^2)	190	290	165
α (sec^{-1})	0.031	0.010	0.009

REFERENCES

Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, andB. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3(5):466-472.

Berridge, M.J., andA. Galione. 1988. Cytosolic calcium oscillators. *Faseb J* 2(15):3074-3082.

Chamaraux, F., S. Fache, F. Bruckert, andB. Fourcade. 2005. Kinetics of cell spreading. *Phys Rev Lett* 94(15):158102.

Cornillon, S., L. Gebbie, M. Benghezal, P. Nair, S. Keller, B. Wehrle-Haller, S.J. Charette, F. Bruckert, F. Letourneur, andP. Cosson. 2006. An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep* 7(6):617-621.

Cuvelier, D., M. Thery, Y.S. Chu, S. Dufour, J.P. Thiery, M. Bornens, P. Nassoy, andL. Mahadevan. 2007. The universal dynamics of cell spreading. *Curr Biol* 17(8):694-699.

Decave, E., D. Garrivier, Y. Brechet, B. Fourcade, andF. Bruckert. 2002. Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J* 82(5):2383-2395.

Decave, E., D. Rieu, J. Dalous, S. Fache, Y. Brechet, B. Fourcade, M. Satre, andF. Bruckert. 2003. Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci* 116(Pt 21):4331-4343.

Dobereiner, H.G., B. Dubin-Thaler, G. Giannone, H.S. Xenias, andM.P. Sheetz. 2004. Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys Rev Lett* 93(10):108105.

Fache, S., J. Dalous, M. Engelund, C. Hansen, F. Chamaraux, B. Fourcade, M. Satre, P. Devreotes, andF. Bruckert. 2005. Calcium mobilization stimulates Dictyostelium discoideum shear-flow-induced cell motility. *J Cell Sci* 118(Pt 15):3445-3457.

Fajardo, M., M. Schleicher, A. Noegel, S. Bozzaro, S. Killinger, K. Heuner, J. Hacker, andM. Steinert. 2004. Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of Legionella pneumophila in Dictyostelium discoideum. *Microbiology* 150(Pt 9):2825-2835.

Giannone, G., B. Dubin-Thaler, H.G. Dobereiner, N. Kieffer, A.R. Bresnick, andM. Sheetz. 2004. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* 116:431-443.

Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, andG.M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(4):975-978.

Lee, J., M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, andK. Jacobson. 1994. Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol* 127(6 Pt 2):1957-1964.

Merlot, S., andR.A. Firtel. 2003. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* 116(Pt 17):3471-3478.

Meyer-Bernstein, E.L., andA. Sehgal. 2001. Molecular regulation of circadian rhythms in Drosophila and mammals. *Neuroscientist* 7(6):496-505.

Parent, C.A., andP.N. Devreotes. 1999. A cell's sense of direction. *Science* 284(5415):765-770.

Pierres, A., P. Eymeric, E. Baloche, D. Touchard, A.M. Benoliel, andP. Bongrand. 2003. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys J* 84(3):2058-2070.

Pring, M., L. Cassimeris, andS.H. Zigmond. 2002. An unexplained sequestration of latrunculin A is required in neutrophils for inhibition of actin polymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* 52(2):122-130.

Raucher, D., andM.P. Sheetz. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* 148(1):127-136.

Reinhart-King, C.A., M. Dembo, andD.A. Hammer. 2005. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J* 89(1):676-689.

Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, andA.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153(6):1175-1186.

Savitzky, A., andM.J.E. Golay. 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*(36):1627-1639.

Sengupta, K., H. Aranda-Espinoza, L. Smith, P. Janmey, andD. Hammer. 2006. Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophys J* 91(12):4638-4648.

Shenderov, A.D., andM.P. Sheetz. 1997. Inversely correlated cycles in speed and turning in an ameba: an oscillatory model of cell locomotion. *Biophys J* 72(5):2382-2389.

Simson, R., E. Wallraff, J. Faix, J. Niewohner, G. Gerisch, andE. Sackmann. 1998. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys J* 74(1):514-522.

Steiner, J., Y. Termonia, andJ. Deltour. 1972. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure. *Analytical Chemistry*(44):1906-1909.

Stepanovic, V., D. Wessels, K. Daniels, W.F. Loomis, andD.R. Soll. 2005. Intracellular role of adenylyl cyclase in regulation of lateral pseudopod formation during Dictyostelium chemotaxis. *Eukaryot Cell* 4(4):775-786.

Thery, M., andM. Bornens. 2006. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 18(6):648-657.

Thery, M., V. Racine, M. Piel, A. Pepin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.B. Sibarita, andM. Bornens. 2006. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52):19771-19776.

Uchida, K.S., T. Kitanishi-Yumura, andS. 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(Pt 1):51-60.

Watts, D.J., andJ.M. Ashworth. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J* 119(2):171-174.

Weber, I., E. Wallraff, R. Albrecht, andG. 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):1519-1530.

Wessels, D., D.F. Lusche, S. Kuhl, P. Heid, andD.R. Soll. 2007. PTEN plays a role in the suppression of lateral pseudopod formation during Dictyostelium motility and chemotaxis. *J Cell Sci* 120(Pt 15):2517-2531.

Wessels, D.J., H. Zhang, J. Reynolds, K. Daniels, P. Heid, S. Lu, A. Kuspa, G. Shaulsky, W.F. Loomis, andD.R. Soll. 2000. The internal phosphodiesterase RegA is essential for the suppression of lateral pseudopods during Dictyostelium chemotaxis. *Mol Biol Cell* 11(8):2803-2820.

Wittenberg, C., andS.I. Reed. 2005. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24(17):2746-2755.

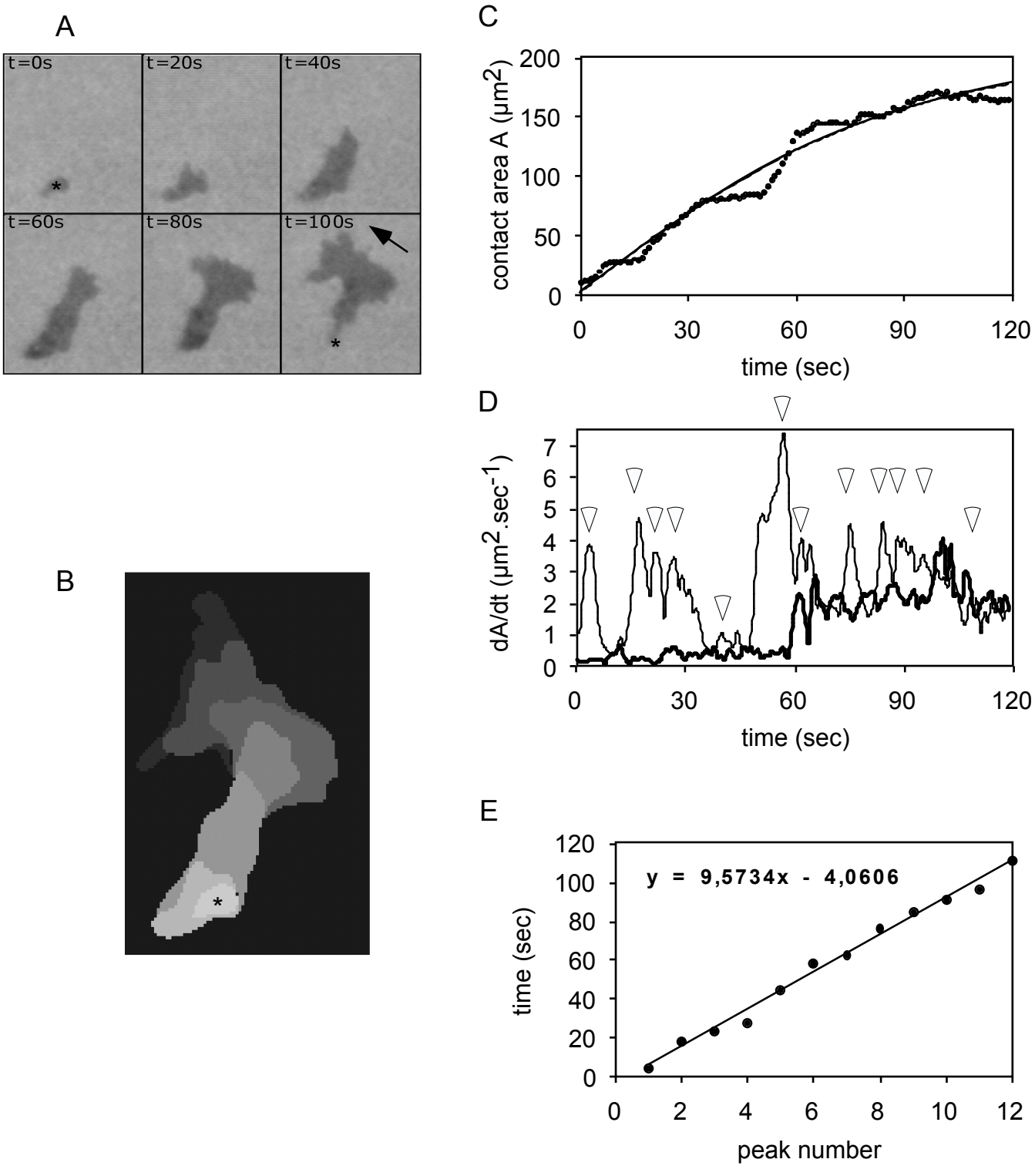

A
t=0s
t=20s
t=40s
t=60s
t=80s
t=100s
B
C
contact area A (µm2)
200
150
100
50
0
0
30
60
90
120
time (sec)
D
dA/dt (µm2.sec-1)
7
6
5
4
3
2
1
0
0
30
60
90
120
time (sec)
E
y = 9,5734x - 4,0606
time (sec)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
peak number

Fig 1

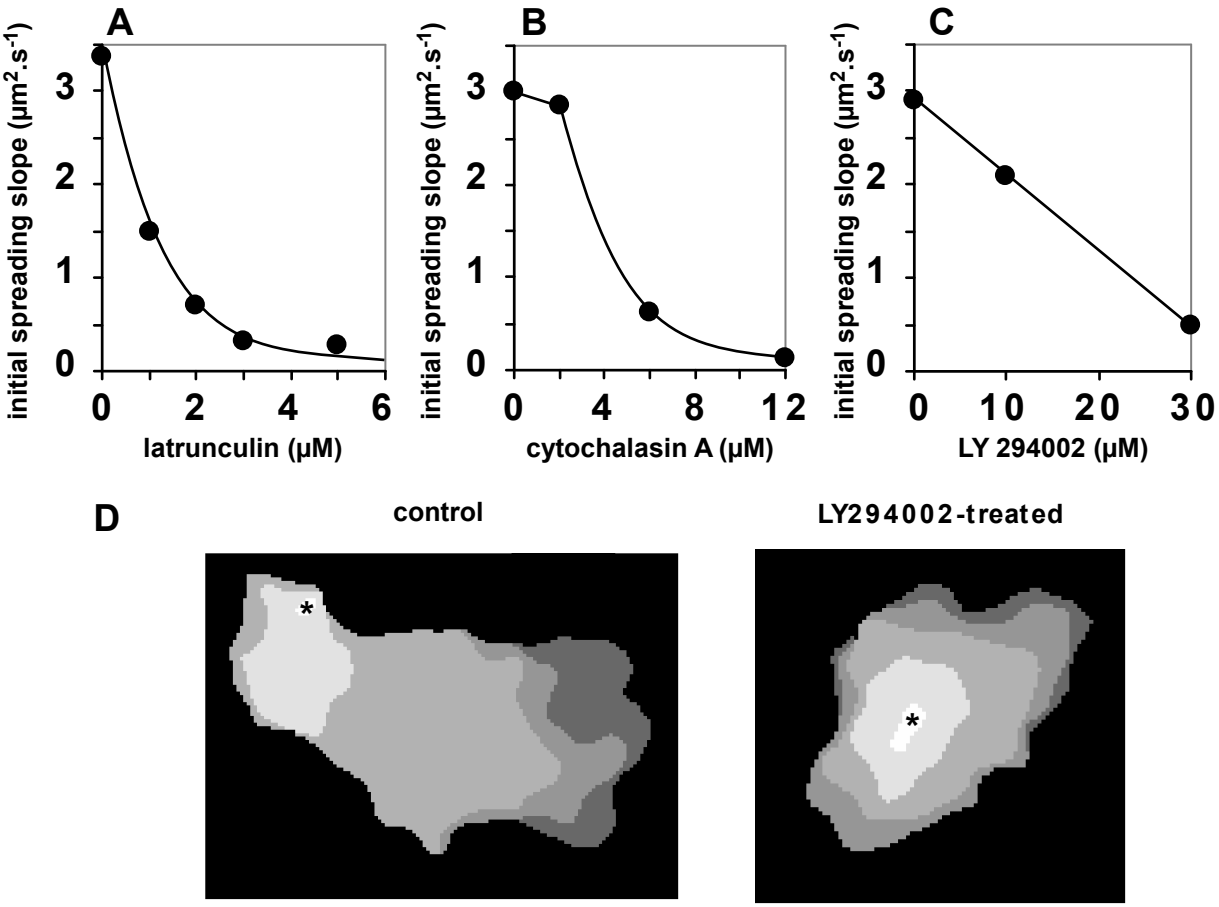

A
B
C
initial spreading slope (µm².s⁻¹)
0
1
2
3
0
2
4
6
latrunculin (µM)
0
4
8
12
cytochalasin A (µM)
0
10
20
30
LY 294002 (µM)
D
control
LY294002-treated
*
*

Fig. 2

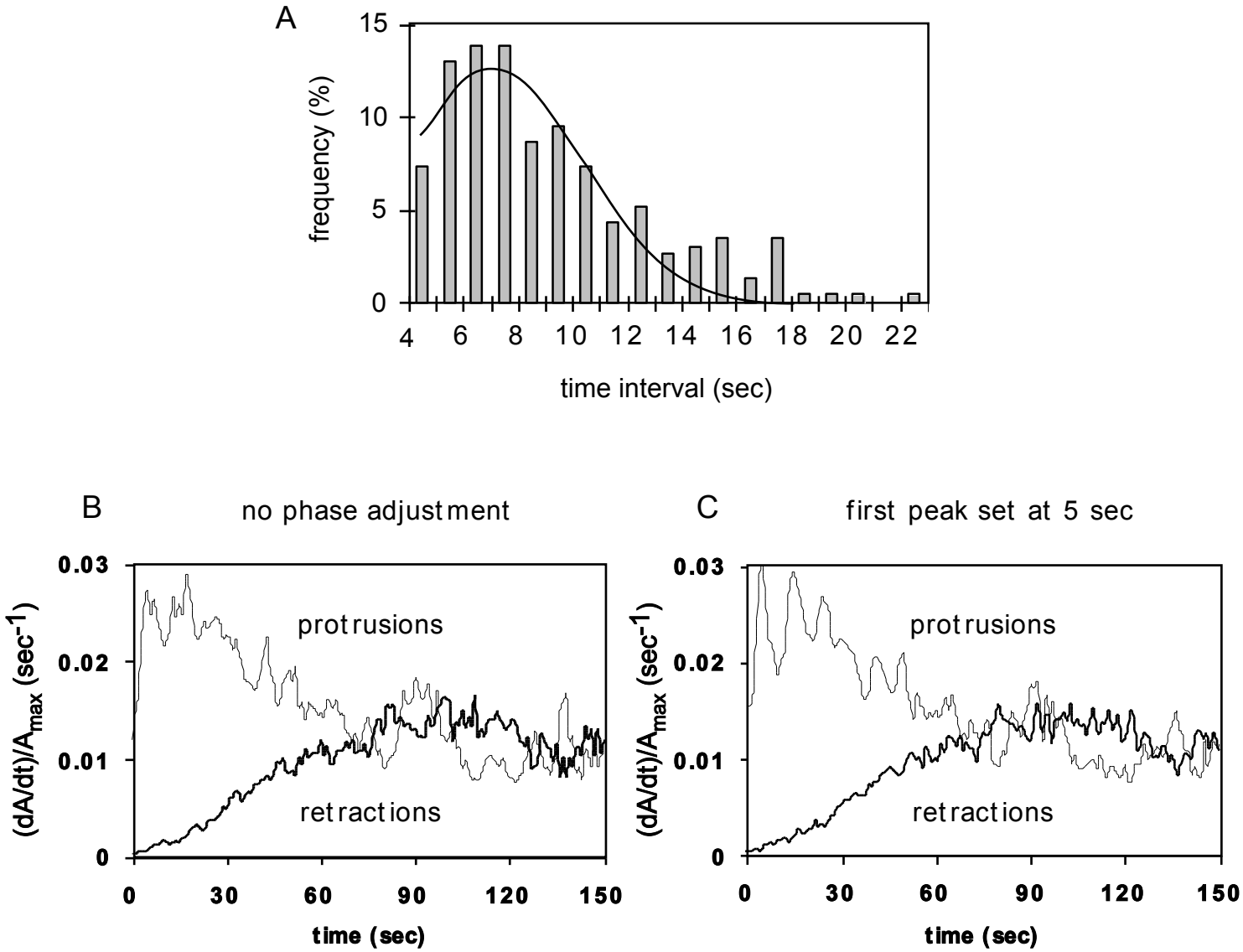

A
frequency (%)
15
10
5
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
time interval (sec)
B
no phase adjustment
C
first peak set at 5 sec
(dA/dt)/A_max (sec^-1)
0.03
0.02
0.01
0
protrusions
retractions
0
30
60
90
120
150
time (sec)

Fig.3

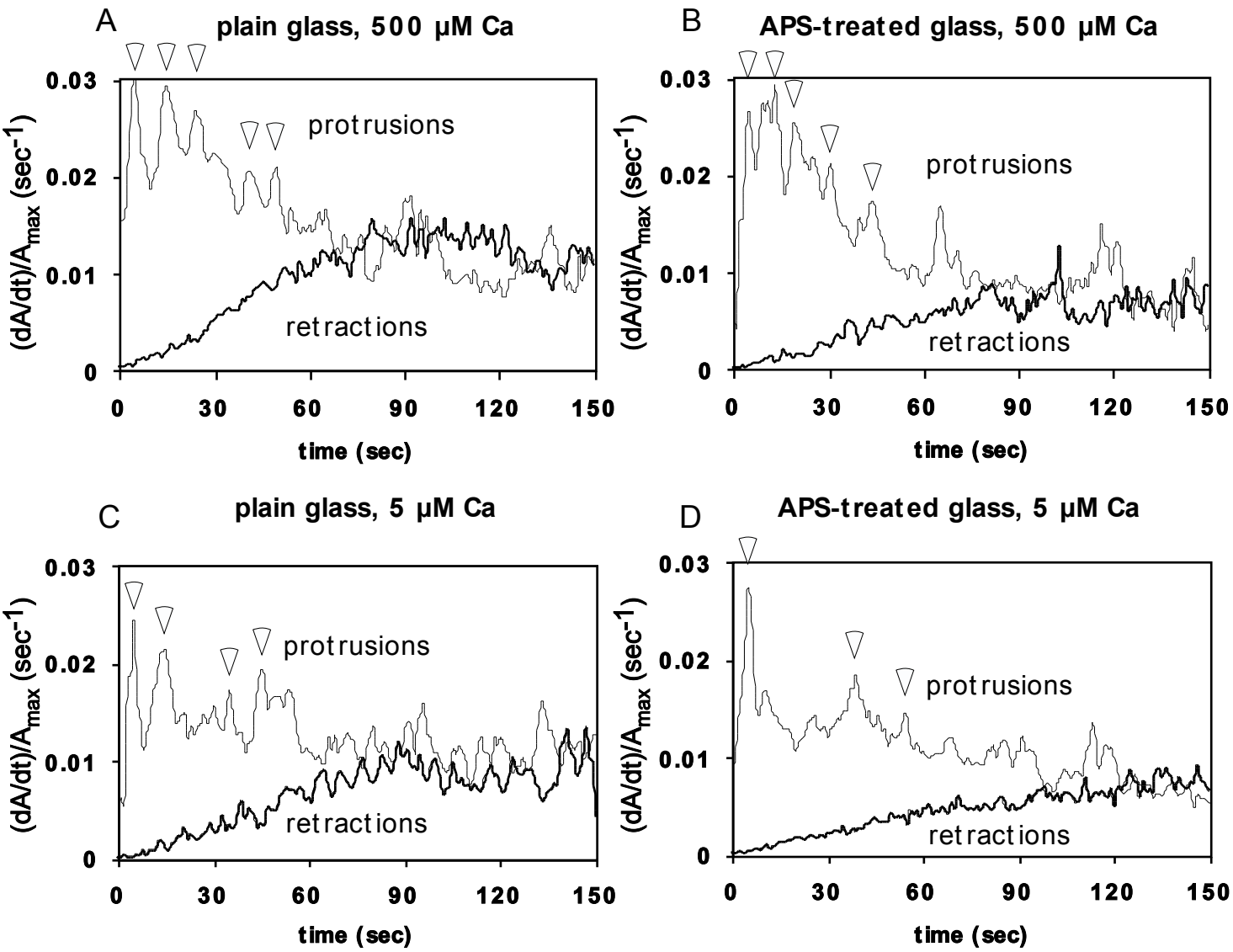

A
plain glass, 500 μM Ca
B
APS-treated glass, 500 μM Ca
C
plain glass, 5 μM Ca
D
APS-treated glass, 5 μM Ca
protrusions
retractions
(dA/dt)/A_max (sec^-1)
time (sec)
0
0.01
0.02
0.03
0
30
60
90
120
150

Fig.4

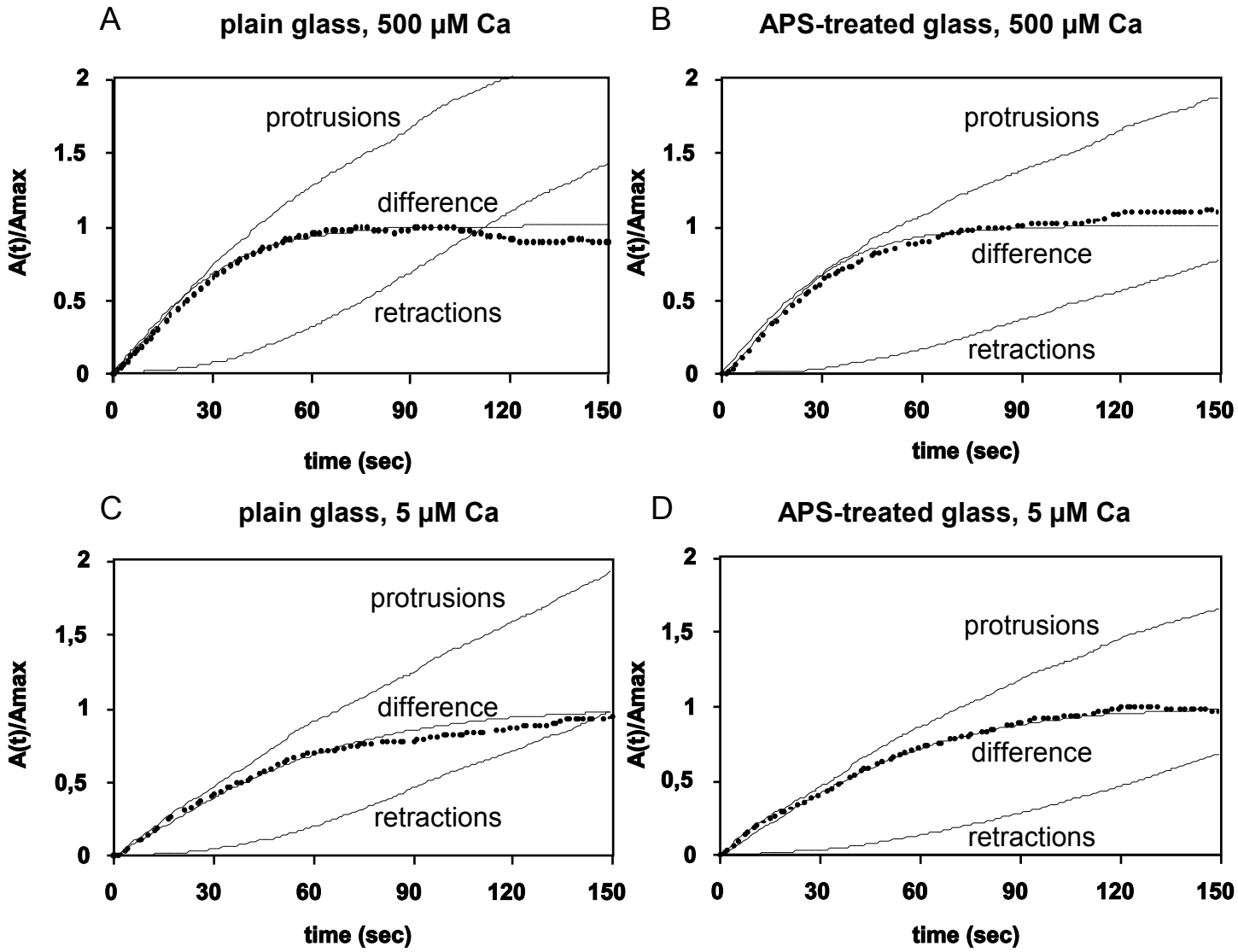

A
plain glass, 500 µM Ca
B
APS-treated glass, 500 µM Ca
C
plain glass, 5 µM Ca
D
APS-treated glass, 5 µM Ca
protrusions
difference
retractions
A(t)/Amax
time (sec)
0
30
60
90
120
150
0
0.5
1
1.5
2
0,5
1,5

Fig.5

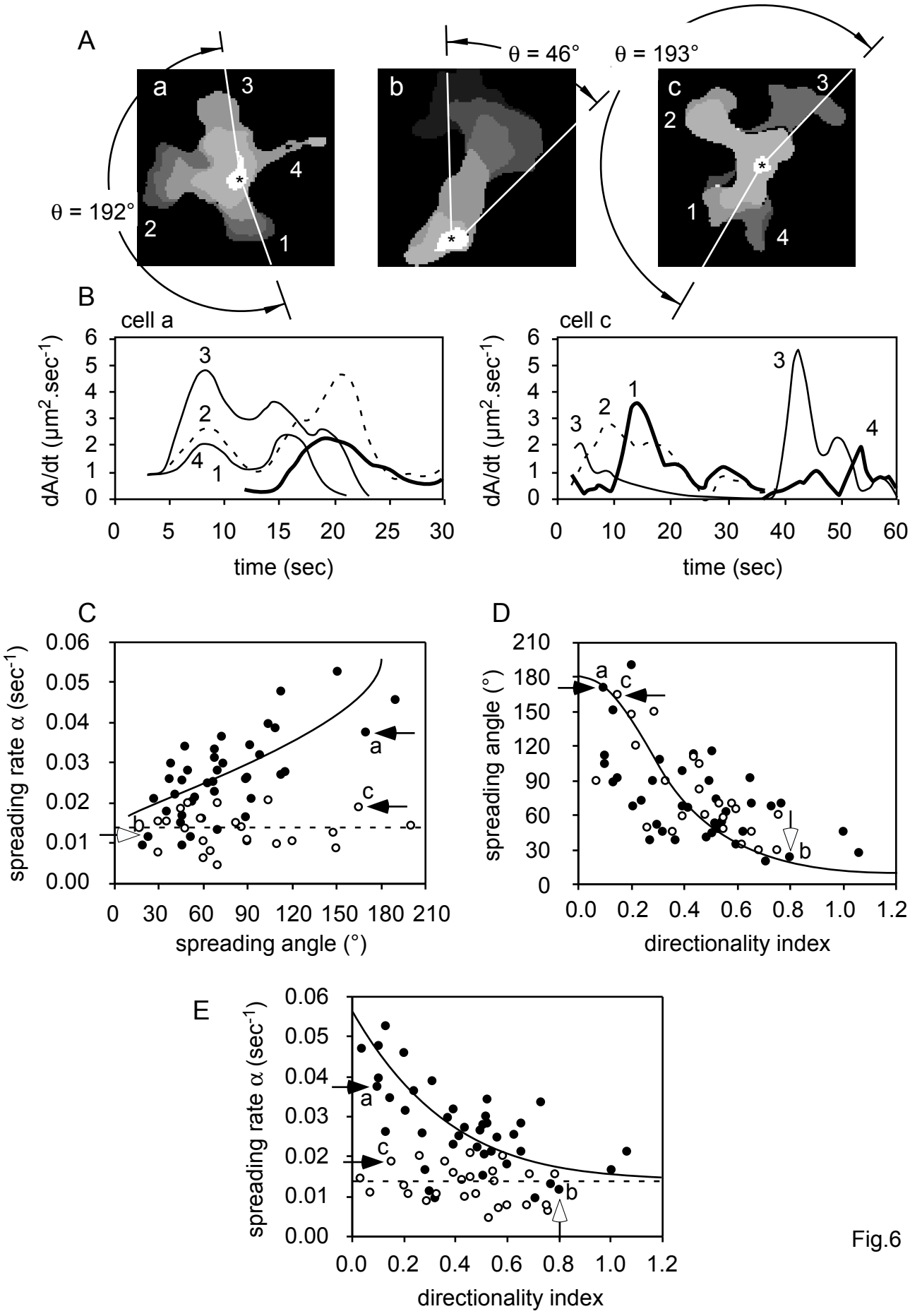

A
a
b
c
θ = 46°
θ = 193°
θ = 192°
1
2
3
4
B
cell a
cell c
dA/dt (μm².sec⁻¹)
time (sec)
C
spreading rate α (sec⁻¹)
spreading angle (°)
D
spreading angle (°)
directionality index
E
spreading rate α (sec⁻¹)
directionality index

Fig.6

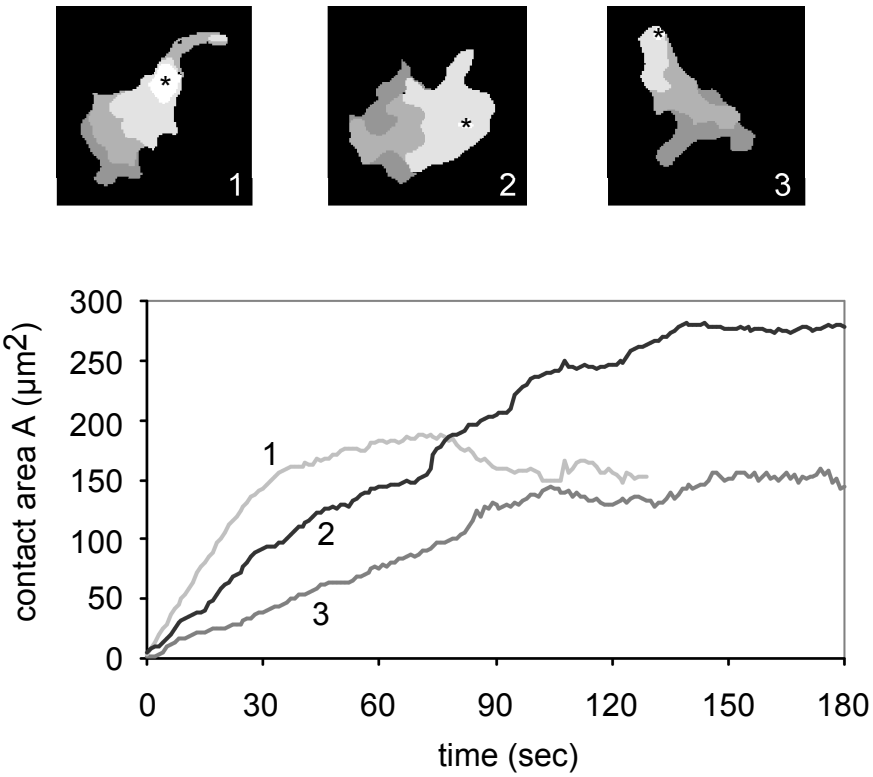

1
2
3
contact area A (µm2)
300
250
200
150
100
50
0
0
30
60
90
120
150
180
time (sec)

Fig. S1

Français

L'amibe *Dictyostelium discoideum* est un eucaryote unicellulaire capable de se déplacer et de se nourrir par phagocytose. Cet organisme est très utilisé pour décrypter les mécanismes moléculaires du chimiotactisme et de la motilité cellulaire. Les travaux de S.Fache au laboratoire ont notamment montré que la motilité de *Dictyostelium* est stimulée par une contrainte mécanique, et que la vitesse atteinte dépend du calcium extracellulaire.
Dans ce travail, nous avons étudié l'étalement de *Dictyostelium* sur un substrat, processus qui peut être apparenté à certaines étapes de la motilité cellulaire. Nous avons montré que l'étalement de *Dictyostelium* est un processus quasi-linéaire et anisotrope. De plus, nous avons mis en évidence des variations périodiques de l'aire gagnée par les cellules dont nous n'avons pu identifier l'origine moléculaire.
Ces travaux sur l'étalement cellulaire nous ont permis de caractériser le rôle de la protéine Phg2 dans la motilité cellulaire. Phg2 est une kinase connue pour être impliquée dans la phagocytose et la motilité. Nous avons établi que Phg2 contrôle la polarisation cellulaire via son domaine de liaison aux protéines de type Ras, et joue également un rôle dans la polymérisation locale de l'actine via son domaine kinase.
Enfin, nous avons inactivé deux gènes codant pour des canaux calciques chez *Dictyostelium*, et les études préliminaires menées semblent indiquer qu'ils ne participent pas à la réponse calcique de la motilité induite par une contrainte.

English

Dictyostelium discoideum is a unicellular eukaryote with abilites to crawl on surfaces and feed on bacteria. It is widely used as a model for chemotaxis and cell motility. In our laboratory, S.Fache showed that the motility of *Dictyostelium* is enhanced by shear stress, and that the maximal speed depends on extracellular calcium concentration.
In this work, we have studied the spreading of Dictyostelium on a surface. This process is similar to the first step of cell motility. We have shown that Dictyostelium spreading is quasi-linear and anisotrope. Furthermore, we have discovered a periodic activity in the speed of gain and loss area during spreading. The molecular origin of this activity is unknown.
These works on cellular spreading enable us to characterize the function of the protein Phg2 during cell motility. Phg2 is a kinase involved in phagocytosis and motility. We have established that Phg2 controls cell polarity through it's Ras Binding Domain. Phg2 also controls local actin polymerisation through it's kinase domain.
Finally, we knocked out two genes coding for potential calcium channels in *Dictyostelium*.
The studies we have led with the mutant cells suggest that they are not involved in the calcium response during shear stress induced cell motility.

Mots clef :

Dictyostelium discoideum, étalement, motilité, oscillations, canaux calciques.