

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI  
- U.F.R. Scientifique d'ORSAY -

Spécialité : BIOCHIMIE – BIOPHYSIQUE

Présentée par

**Vincent DELATOUR**

*Propulsion de liposomes géants par polymérisation  
d'actine: un modèle pour l'interaction dynamique  
cytosquelette-membrane dans la motilité*

Soutenue le Vendredi 14 septembre 2007 devant un jury composé de :

Dr. Giuseppe BALDACCI  
Dr. Cécile SYKES  
Dr. Bruno ANTONNY  
Dr. Emmanuèle HELFER  
Dr. Marie-France CARLIER

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Co-directrice de thèse  
Directrice de thèse



## ***Remerciements.***

Je remercie Madame Marie-France Carlier et Monsieur Dominique Pantaloni pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe dans le Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales au CNRS. Je les remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir recruté sur les fonds propres du laboratoire : me montrer digne de cette confiance aura joué un rôle moteur dans ma motivation. Je les remercie également de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans un laboratoire de réputation internationale et de travailler dans un environnement extrêmement stimulant: ce fut une chance immense et cette expérience me laissera à jamais un souvenir ému.

Je tiens à remercier sincèrement Emmanuèle Helfer qui a encadré ma thèse et qui m'a guidé tout au long de ces quatre années de thèse. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir toujours poussé à faire preuve de rigueur et de pragmatisme et encouragé à poursuivre mes efforts dans la difficulté. Je la remercie également d'avoir toujours pris le temps de m'aider dans l'écriture des nombreux documents que j'ai été amené à rédiger (je pense notamment à toutes les demandes de bourses : ARC, FRM, La Ligue, Boehringer, etc...) et pour m'avoir aidé à tenir un discours clair, précis et concis à l'occasion des congrès auxquels j'ai participé.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Guillaume Romet-Lemonne pour sa constante disponibilité, son enthousiasme et la pertinence de ses conseils. Son aura positive ainsi sa force de proposition ont été déterminants pour mener mon travail à bien. Je le remercie également pour l'aide considérable qu'il m'a apportée dans l'écriture des articles concrétisant mes expériences et pour avoir toujours su me conseiller lors du choix des expériences appropriées, leur analyse et pour orienter ma réflexion dans des directions judicieuses.

Je remercie Monsieur Giuseppe Baldacci pour avoir accepté de présider mon jury, et les nombreux conseils qu'il m'a prodigués au cours de ma thèse. Je le remercie de m'avoir permis de suivre des formations dispensées par d'autres écoles doctorales, preuve que l'épanouissement du doctorant est au centre des préoccupations de l'école doctorale Gènes, Génomes, Cellules. Je remercie également mes rapporteurs et examinateurs, Cécile Sykes, Bruno Antonny et Didier Job pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour leur intérêt pour le travail ayant occupé quatre années de ma vie.

Merci à Ruben Gracia et Reinhard Lipowsky du Max Planck Institute of Colloids and Interfaces de Golm en Allemagne pour la richesse des échanges réalisés au cours de la collaboration qui nous a permis de faire travailler ensemble expérimentateurs et théoriciens.

Un grand merci à toutes les personnes du LEBS, et en particulier tous les membres de l'équipe : Andréa, Christophe, Maud, Stéphane, Diep, Montse, Louis, Ksenia, Dominique, Shashank pour les discussions, leur soutien et leur accueil au sein de cette équipe d'exception.

Je remercie tous ceux qui m'ont donné le goût des sciences : Madame Bronquard, professeur de biologie dans mon Jura natal et grâce à qui j'ai découvert ma vocation pour la biochimie, ainsi que mes anciens collègues du CEA, qui m'ont encouragé à faire une thèse.

Je remercie mes parents, qui m'ont très tôt fait prendre conscience de la valeur du travail et encouragé à poursuivre mes études pour aller au bout de mes projets. Je remercie également mes ami(e)s qui m'ont soutenu pendant ma thèse et bien avant cela : Alexandre, Pierre-Yves, Baff, Fafou, Will, Eva, Mag, Ian, Antony, Jean-Marie, Fridolyn, Jean-Christophe, Elodie, Manel, Caroline, Nicolas, Zoltan, ainsi que toutes celles et ceux que j'oublie ! Ce travail n'aurait pas été possible non plus sans tout le soutien d'Amandine : son amour et sa présence ont transformé ma vie et fait de moi celui que je suis aujourd'hui.

Enfin, je remercie l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour son soutien financier.



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie A : Actine et motilité cellulaire</b> .....	<b>3</b>
I Introduction générale : le cytosquelette .....	3
II L'actine .....	5
1° Généralités .....	5
2° La polymérisation de l'actine .....	7
3° Hydrolyse de l'ATP et phénomène de tapis roulant (treadmilling) .....	8
II Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine .....	10
1° La profiline et les protéines séquestrantes .....	10
2° L'ADF .....	12
3° La gelsoline et les protéines de coiffe du bout barbé .....	13
4° Effet synergique de l'ADF, de la profiline et des protéines de coiffe .....	14
III Régulation de la structure du réseau d'actine .....	15
1° Protéines contrôlant la structure du réseau d'actine .....	15
2° Le complexe Arp2/3 .....	16
3° Activation du complexe Arp2/3 par la signalisation .....	18
4° Mécanisme de nucléation et branchement par Arp2/3 .....	21
IV Motilité cellulaire et changements de forme liés à l'actine .....	24
1° Structures de filaments d'actine .....	24
2° Motilité cellulaire .....	25
<b>Partie B: Systèmes modèles de la motilité</b> .....	<b>29</b>
I Certains pathogènes court-circuitent la signalisation qui mène au complexe Arp2/3 .....	29
1° Propulsion par polymérisation d'actine .....	29
2° Les bactéries propulsées par l'actine: un système modèle .....	32
3° Le milieu de motilité reconstitué .....	34
II Biomimétisme de la motilité : propulsion d'objets artificiels .....	36
1° Objets artificiels rigides .....	37
2° Objets artificiels déformables .....	41
III Modèles biophysiques théoriques .....	44
1° Modèles mécanistiques microscopiques .....	45
2° Modèle mésoscopique élastique .....	49
<b>Partie C : Membranes biologiques et membranes reconstituées</b> .....	<b>51</b>
I Membranes biologiques .....	51
1° Rôle et composition des membranes biologiques .....	51
2° Une propriété importante des membranes : leur 'fluidité' .....	52
3° Le modèle de la membrane cellulaire .....	53
II Membranes artificielles .....	54
1° Les liposomes .....	54
2° Mélanges de lipides .....	56
III Physique des membranes .....	58
<b>Position du sujet</b> .....	<b>61</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>65</b>
<b>Chapitre I : Mise au point du système biomimétique</b> .....	<b>67</b>
I Synthèse de liposomes géants unilamellaires par électroformation .....	67
1° Choix des lipides .....	67
2° Gonflement de liposomes géants unilamellaires sous champ électrique .....	71

II Fonctionnalisation des vésicules .....	84
1°) <i>Nature de la protéine activatrice</i> .....	84
2°) <i>Fonctionnalisation des vésicules et densité surfacique d'activateurs</i> .....	85
3°) <i>Calibration de la fluorescence des activateurs à la surface des liposomes: quantification absolue de la densité surfacique d'activateurs</i> .....	87
III Composition du milieu de motilité.....	94
1°) <i>Protéines</i> .....	94
2°) <i>Sels</i> .....	95
3°) <i>ATP, DTT, DABCO, NaN<sub>3</sub>, méthylcellulose</i> .....	95
4°) <i>Solution correctrice et contrôle de la pression osmotique</i> .....	96
<b>Chapitre II : Initiation du mouvement</b> .....	<b>101</b>
I Préparation des échantillons .....	101
1°) <i>Croissance du gel initial</i> .....	101
2°) <i>Influence de la proportion de lipides nickel dans les membranes</i> .....	102
3°) <i>Brisure de symétrie et expulsion de la vésicule</i> .....	104
4°) <i>La brisure de symétrie s'accompagne d'une polarisation des activateurs</i> .....	107
5°) <i>Il existe différents types de propulsion : régimes continu et saltatoire</i> .....	109
<b>Chapitre III – Rôle de la mobilité des activateurs à la surface des vésicules</b> .....	<b>113</b>
I Conditions de prédominance du type de mouvement: saltatoire ou continu .....	113
1°) <i>Effet de l'ADF</i> .....	114
2°) <i>Effet de l'Arp2/3 et de la gelsoline</i> .....	115
II Caractéristiques mésoscopiques du mouvement saltatoire.....	119
1°) <i>Structure de la comète de vésicules saltatoire : densité de branchement</i> .....	119
2°) <i>Le pas de la comète dépend du diamètre de la vésicule</i> .....	121
3°) <i>Vitesse moyenne et période en fonction de la concentration d'Arp2/3</i> .....	124
III Analyse dynamique du mouvement saltatoire .....	125
1°) <i>Analyse fine de la vitesse et de la déformation des vésicules au cours d'un saut</i> ...	125
2°) <i>Répartition des activateurs pendant les mouvements continu et saltatoire</i> .....	127
<b>Chapitre IV : Analyse du mécanisme d'interaction activateur - filament</b> .....	<b>135</b>
I Arp2/3 contrôle le taux de ségrégation de N-WASP.....	135
II Arp2/3 est ségrégué au cours du mouvement.....	137
III Vésicules fonctionnalisées avec des fragments de N-WASP.....	138
1°) <i>Les vésicules N-WASP et VCA ont un comportement semblable</i> .....	139
2°) <i>Les vésicules V ne génèrent pas de gel d'actine</i> .....	139
3°) <i>Le comportement des vésicules VC est différent de celui des vésicules NW et VCA</i> .....	140
IV VCA covalamment lié à un monomère d'actine sur le domaine WH2.....	147
V Modèles théoriques de ségrégation-diffusion.....	150
1°) <i>Principe</i> .....	150
2°) <i>Géométrie du système et conditions limites</i> .....	151
3°) <i>Bilan des flux à l'état stationnaire</i> .....	152
4°) <i>Choix des paramètres <math>v</math>, <math>ku</math>, <math>kb</math> et <math>D</math></i> .....	154
5°) <i>Résultats</i> .....	157
<b>Chapitre V : Étude des forces générées par le gel d'actine</b> .....	<b>161</b>
I Estimation de la tension de surface et la rigidité de courbure .....	162
II Analyse des contours et mesure des densités d'actine et de N-WASP.....	163
III Bilan des forces sur une vésicule déformée par la comète d'actine.....	164
IV Résolution de l'équation et détermination de la forme de la vésicule.....	167
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>171</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>183</b>
<b>Articles</b> .....	<b>195</b>





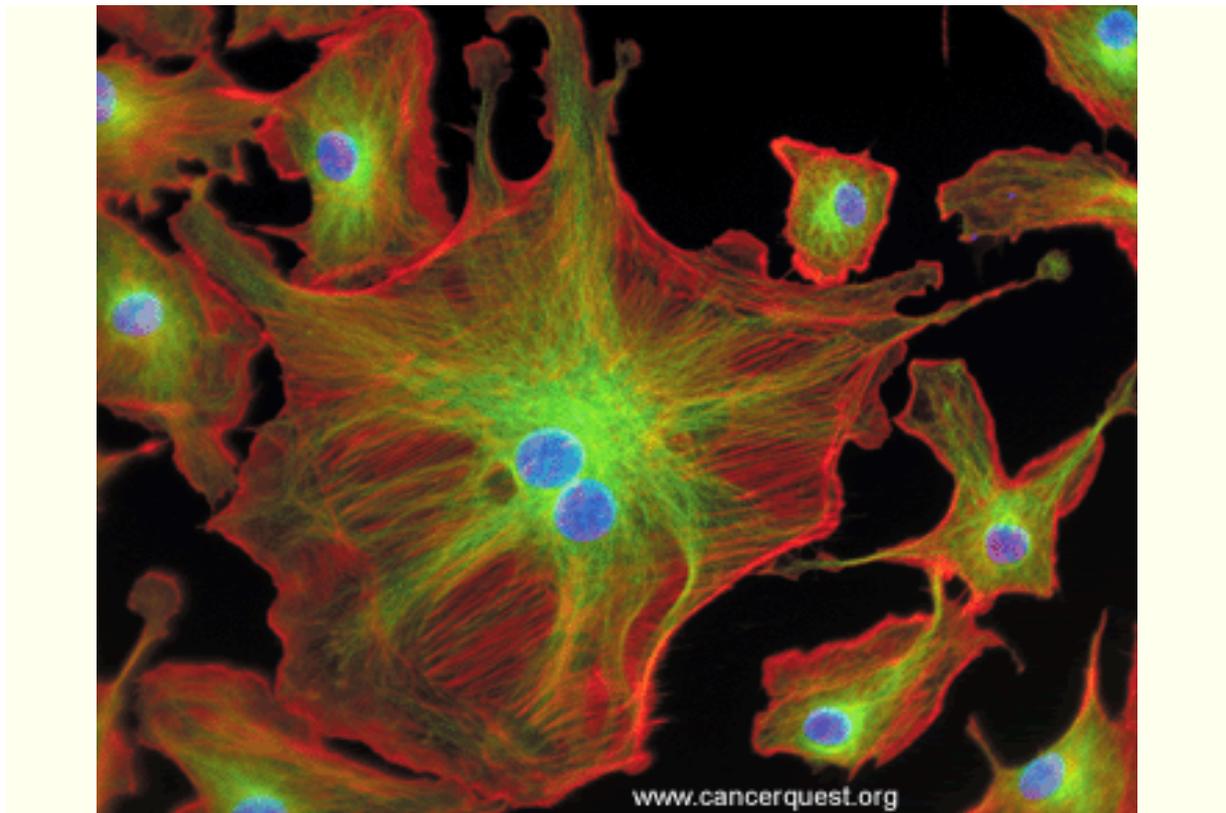
# *Introduction*



# Partie A : Actine et motilité cellulaire

## I Introduction générale : le cytosquelette

Comme haubans et mât soutiennent l'armature d'un bateau, le cytosquelette, composé d'un réseau de fibres protéiques, apporte à la cellule le soutien mécanique qui lui permet de conserver sa forme caractéristique. Cette notion de structure responsable de la résistance mécanique des cellules fut proposée pour la première fois en 1931 par le biologiste français Paul Wintrebert. Structure hypothétique à l'époque, le cytosquelette devint observable une décennie plus tard grâce à l'introduction de la microscopie électronique en biologie. Depuis les années 1970, des réactifs ciblant les composants du cytosquelette et le marquage fluorescent permettent de l'étudier dans les cellules vivantes (Figure A1).



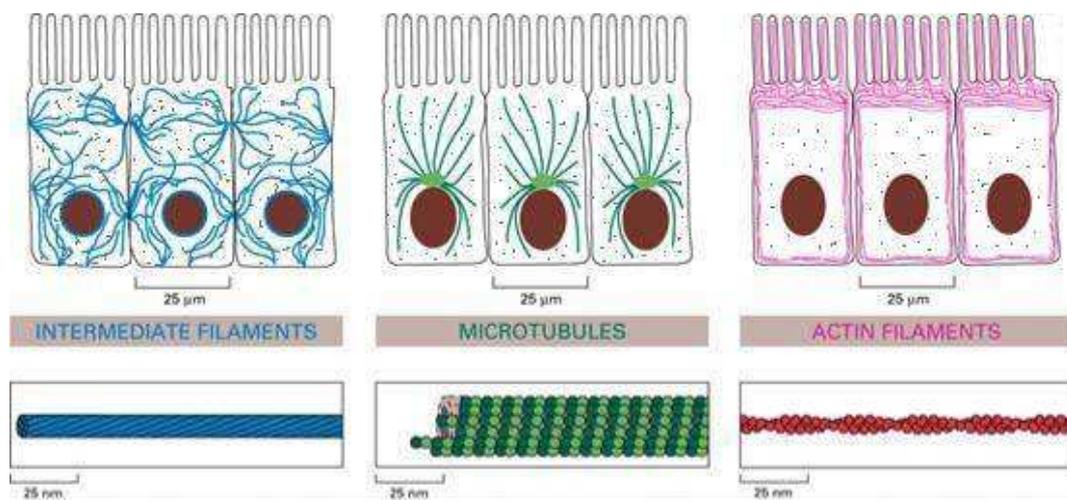
**Figure A1: Cellules endothéliales vues au microscope.**

*Les microtubules sont marqués en vert par un anticorps, l'actine est marquée à la phalloïdine (en rouge) et les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Source : Cancerquest.org.*

Le cytosquelette est une structure très dynamique car les polymères qui le constituent s'assemblent et se désassemblent en permanence. Ces réactions permettent aux cellules eucaryotes d'adopter une grande variété de formes et d'effectuer des mouvements coordonnés. Les fibres du cytosquelette constituent donc non seulement l'«ossature» de la cellule mais aussi la «musculature» qui lui permet de se déplacer (Rafelski and Theriot 2004).

La biologie cellulaire et la biochimie ont montré que le cytosquelette était fortement impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales telles que la phagocytose, l'établissement de la polarité des cellules, leur adhésion à un support ou entre elles, la formation du fuseau mitotique et de l'anneau contractile permettant la division cellulaire, le transport vésiculaire participant aux mécanismes d'endocytose et d'exocytose (Chen et al. 2003)

Le cytosquelette eucaryote (2.8% des protéines animales) est constitué de trois grands types de fibres protéiques, très conservées dans l'évolution : les microtubules, les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires (Figure A2). Ces fibres sont formées par l'auto-association de protéines monomériques en filaments. Elles interagissent avec un grand nombre de partenaires : des protéines cytoplasmiques (protéines motrices, protéines organisatrices, protéines sous-membranaires) ou des protéines associées à la membrane (protéines d'adhésion...), ce qui leur confère des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques. Les trois types de biopolymères se distinguent par leur diamètre, leurs propriétés mécaniques et biochimiques, leur localisation cellulaire, et leur fonction.



**Figure A2: Organisation des éléments du cytosquelette d'une cellule épithéliale.**

*A gauche les filaments intermédiaires (en bleu), au milieu les microtubules (en vert), à droite les filaments d'actine (en rose). Source : [www.bio.espci.fr/scolarité/c\\_BIO/cell/cell21.jpg](http://www.bio.espci.fr/scolarité/c_BIO/cell/cell21.jpg).*

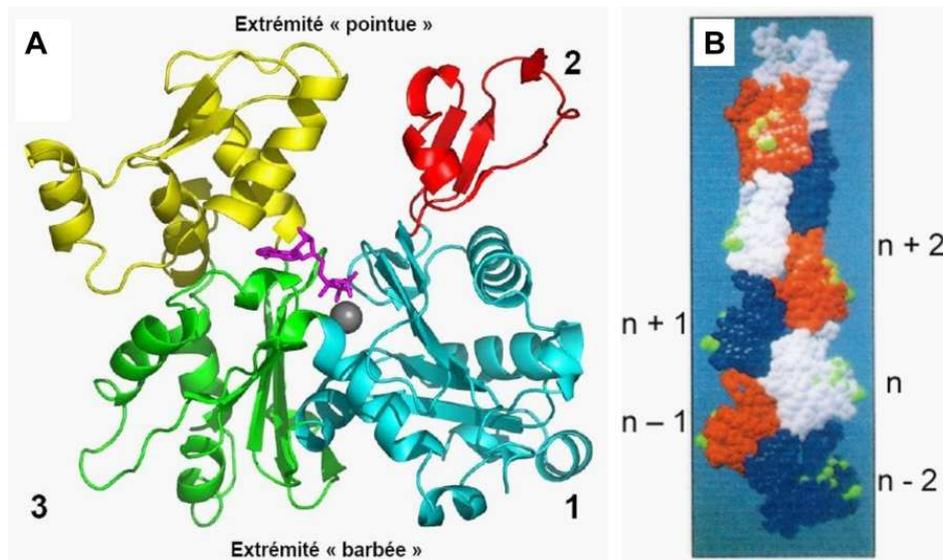
## **II L'actine**

### **1°) Généralités**

L'actine fut nommée et caractérisée biochimiquement par Bruno Straub, qui l'a purifiée à partir de muscle squelettique. Elle est abondante dans toutes les cellules eucaryotes, même non musculaires, où elle représente typiquement 5 à 10% de la masse protéique pour une concentration dans le cytosol de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de micromolaires. C'est une protéine extraordinairement conservée au cours de l'évolution. La conservation remarquable de certains résidus souligne leur implication dans des interactions essentielles pour la structure du filament.

L'actine monomérique, aussi appelée actine-G, est une protéine globulaire de 42 kDa. Elle a été cristallisée en complexe avec diverses protéines qui inhibent la polymérisation, ou après mutagenèse ou marquage covalent pour inhiber la polymérisation. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 375 acides aminés repliée en 2 lobes de taille équivalente liés par une crevasse (Figure A3-A). Les 2 lobes sont eux-mêmes divisés en 2 sous-domaines : le petit domaine, qui comprend les sous-domaines 1 et 2, et le grand domaine, qui comprend les sous-domaines 3 et 4. Les sous-domaines 1 et 3 sont exposés à l'extrémité que l'on appelle barbée (+) du filament d'actine et les sous-domaines 2 et 4 sont exposés à l'extrémité dite pointue (-) (Figure A3-B).

Dans la crevasse située à la jonction de ces 4 sous-domaines est logé un nucléotide (l'ATP ou l'ADP selon son état de phosphorylation) en complexe avec un cation divalent métallique ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) qui interagit directement avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. Le phosphate  $\gamma$  de l'ATP établit des liaisons hydrogènes avec la glycine 158 et la sérine 14, ce qui maintient les 2 lobes rapprochés (Sablin et al. 2002). Lorsque le monomère d'actine est lié à l'ADP, il a été proposé que le pont maintenant la crevasse fermée soit rompu suite au changement de chélation de l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  initialement lié aux phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP et que la structure correspondante de l'actine-ADP soit plus ouverte que celle de l'actine-ATP. Cependant, il n'en existe aucune preuve, puisque les structures cristallisées d'actine portant de l'ATP ou de l'ADP connues à ce jour sont identiques. À la base de la molécule, 2 hélices  $\alpha$  de la crevasse constituent une charnière dont la flexibilité autorise un mouvement relatif des 2 lobes et permet l'échange du nucléotide. Il est à noter qu'en l'absence de ces deux cofacteurs, l'actine se dénature facilement.



**Figure A3: Structures tridimensionnelles de l'actine globulaire et filamenteuse.**

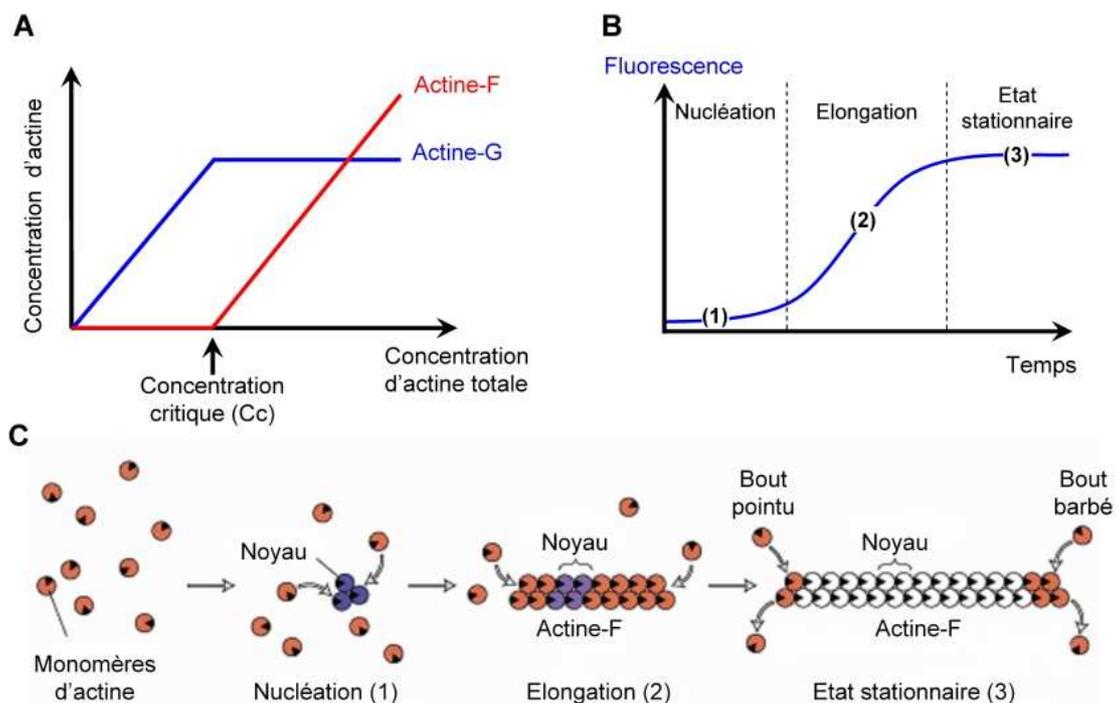
*A. Représentation de la structure tridimensionnelle du monomère en complexe avec la DNase I. L'ADP (en violet) et le Ca<sup>2+</sup> (sphère grise) sont localisés au centre de la molécule. Les sous-domaines 1, 2, 3 et 4 sont représentés respectivement en bleu, rouge, vert et jaune.*

*B. Modèle du filament de Holmes (Holmes et al. 1990). Tous les monomères d'actine ont la même orientation et chacun d'eux établit deux types d'interaction avec ses 4 voisins : des interactions latérales avec les sous-unités n+1 et n-1, et des interactions longitudinales avec les sous-unités n+2 et n-2.*

Les filaments d'actine ont un diamètre d'environ 7 nm et une longueur pouvant atteindre quelques  $\mu\text{m}$  *in vivo*. Leur longueur de persistance est de 7 à 8  $\mu\text{m}$ , ce qui les classe dans la famille des polymères semi-flexibles. Les nombreuses études structurales menées sur l'actine par diffraction des rayons X et par microscopie électronique ont mené au modèle atomique contemporain du filament d'actine : un polymère protéique hélicoïdal ((Holmes et al. 1990) et Figure A3-B). Le filament peut être décrit comme une simple hélice gauche : chaque monomère s'assemble au bout du filament avec un angle de  $-163,2^\circ$  par rapport à la sous-unité précédente et allonge le filament d'une demi-sous-unité, c'est à dire de 2,75 nm. Il y a 13 sous-unités pour 6 tours d'hélice. On peut aussi considérer le filament comme une double hélice droite dont le pas est de 71,5 nm avec 13 sous-unités par tour d'hélice. Dans un filament, toutes les sous-unités ont la même orientation. Cette polarité structurale a été visualisée en microscopie électronique en présence du sous fragment I de la myosine : les têtes de myosine se fixent toutes dans la même orientation et dessinent des pointes de flèche sur les filaments. Par analogie à la structure des pointes de flèches, les deux extrémités ont été appelées extrémité barbée (ou +) et extrémité pointue (ou -) (Milligan et al. 1990). La polarité structurale des filaments d'actine s'accompagne également d'une polarité dynamique : les taux d'association et de dissociation des sous-unités au bout barbée sont plus grands que ceux au bout pointu.

## 2°) La polymérisation de l'actine.

Les filaments d'actine ne se forment qu'au dessus d'une concentration minimale de monomères appelée concentration critique ( $C_c$ ) et dans des conditions de force ionique, de température et de pH bien définies. La polymérisation de l'actine monomérique (actine-G) en filaments d'actine (actine-F) est amorcée par l'ajout d'ions  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  ou  $Na^+$ . Dans les conditions physiologiques (100mM KCl, 1mM  $MgCl_2$ , pH 7,8), l'actine se trouve essentiellement sous sa forme F, en équilibre dynamique avec la forme G. La cinétique de polymérisation de l'actine peut être suivie *in vitro* en utilisant des fluorophores covalentement liés aux monomères, et dont la fluorescence varie avec l'environnement biochimique. Ainsi, on distingue un temps de latence correspondant à une étape initiale de nucléation (formation de noyaux de filaments), suivie d'une phase d'élongation, et enfin l'établissement d'un équilibre appelé état stationnaire (Figure A4).



**Figure A4 : Les différentes phases de la polymérisation de l'actine.**

**A :** Relation entre les fractions d'Actine-G (monomérique) et d'Actine-F (polymérisée) en fonction de la concentration totale d'actine : les filaments d'actine ne se forment qu'au dessus d'une certaine concentration d'actine monomérique appelée concentration critique ( $C_c$ )

**B :** Exemple de cinétique de polymérisation de l'actine par suivi de la fluorescence pyréne. La fluorescence augmente lors du passage de l'état monomérique à l'état polymérisé.

**C :** Représentation des trois phases jalonnant l'assemblage d'un filament d'actine: (1) Phase de nucléation (étape la plus lente) : formation d'un noyau d'actine à partir duquel va s'allonger un filament. (2) Phase d'élongation : les filaments d'actine croissent par ajouts successifs de monomères. (3) Etat stationnaire : toute l'actine est polymérisée à l'exception de l'actine monomérique correspondant à la concentration critique.

Les monomères d'actine étant chargés négativement, il semble a priori difficile de concevoir que ceux-ci puissent s'auto-assembler spontanément. L'activation de l'actine-G à haute force ionique constitue la première étape de la polymérisation. Des ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $K^+$ ) neutralisent les charges négatives à la surface de la protéine et diminuent la répulsion électrostatique entre les monomères, ce qui favorise leur association, probablement en entraînant un changement structural (Carlier et al. 1986), (Cooper et al. 1983)

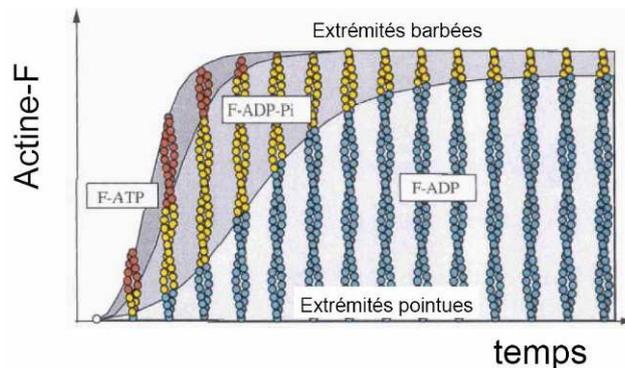
Après la phase d'activation suit une phase dite de nucléation. Le mécanisme de nucléation n'est pas encore totalement élucidé mais il est clair que c'est une réaction coopérative qui constitue l'étape cinétiquement limitante dans la polymérisation. Tout d'abord, deux monomères s'associent par interaction longitudinale pour former un dimère peu stable (Kudryashov et al. 2005). La fixation d'un troisième monomère stabilise le complexe en établissant des interactions latérales avec les deux premières sous-unités et permet d'initier un processus d'isomérisation, aussi appelé mécanisme de condensation hélicoïdale (Oosawa and Kasai 1962). Il y a alors passage d'un polymère linéaire à un trimère hélicoïdal appelé « noyau », qui est le plus petit polymère possédant la structure du filament d'actine (Cooper et al. 1983), (Steinmetz et al. 1997). L'addition de nouvelles sous-unités devient thermodynamiquement plus favorable car chaque sous-unité qui s'ajoute est liée à deux sous-unités d'actine contre une seule dans le noyau initial. La nucléation devient négligeable lorsque le nombre de filaments amorcés est assez grand pour que leur croissance fasse diminuer significativement la concentration de monomères.

Les filaments d'actine s'allongent alors rapidement par addition de monomères aux noyaux hélicoïdaux. L'élongation du filament correspond à la somme des réactions d'association et de dissociation de monomères aux deux extrémités du polymère. Les monomères sont consommés jusqu'à ce que leur concentration atteigne la concentration critique  $C_c$ . A ce moment, la vitesse d'allongement devient globalement nulle : c'est l'état stationnaire. Les filaments coexistent alors avec l'actine monomérique et continuent à échanger des sous-unités avec le milieu.

### **3°) Hydrolyse de l'ATP et phénomène de tapis roulant (treadmilling)**

L'hydrolyse de l'ATP est une réaction irréversible associée à la polymérisation de l'actine. Elle se déroule en 2 phases : le clivage chimique de l'ATP en ADP-Pi est suivi par la dissociation plus lente du phosphate inorganique (Pi).

L'hydrolyse de l'ATP associée à la polymérisation de l'actine- $\text{Ca}^{2+}$ -ATP est très lente. Dans ce cas la polymérisation est quasi-réversible et les concentrations critiques sont identiques aux deux bouts. L'hydrolyse de l'ATP associée à la polymérisation de l'actine- $\text{Mg}^{2+}$ -ATP (cas physiologique) est rapide et vectorielle, c'est à dire se produit selon un mécanisme de fermeture éclair à l'interface F-ADP-Pi/F-ATP. La sous-unité terminale du bout barbé peut donc être sous forme ATP, ADP-Pi ou ADP selon que l'association des sous-unités se déroule plus ou moins vite que l'hydrolyse. (Figure A5)



**Figure A5 : Nature du nucléotide fixé à l'actine-F au cours de la polymérisation**

Tandis que la vitesse d'association de l'actine au bout barbé n'est limitée que par la diffusion, l'extrémité pointue échange plus lentement ses sous-unités et est constituée d'actine-ADP (Carlier and Pantaloni 1986; Korn et al. 1987). Le cycle de renouvellement du filament d'actine à l'état stationnaire comprend les étapes suivantes: la dissociation de l'actine-ADP à l'extrémité pointue, l'échange du nucléotide ADP contre un ATP et l'association d'actine-ATP à l'extrémité barbée. Les deux bouts d'un filament d'actine-Mg ne possèdent donc pas des concentrations critiques différentes et, à l'état stationnaire, ils sont composés de sous-unités qui portent des ligands différents : ADP-Pi pour le bout barbé et ADP pour le bout pointu. L'hydrolyse de l'ATP introduit une polarité thermodynamique qui s'ajoute à la polarité structurale du filament d'actine. A l'état stationnaire, les flux nets de polymérisation et de dépolymérisation aux 2 extrémités sont égaux et de signes opposés. La polymérisation à l'extrémité barbée compense alors exactement la dépolymérisation à l'extrémité pointue. La concentration critique est de  $0,08 \mu\text{M}$  au bout barbé et de  $0,6 \mu\text{M}$  au bout pointu. Ainsi, la vitesse globale d'allongement du filament est nulle et sa longueur reste constante malgré un flux net de sous unités dans le filament. (Figure A5). Ce flux de sous-unités d'actine dans le filament, dit phénomène de tapis roulant ou «treadmilling» est à la base de la motilité cellulaire. Il permet au filament d'avancer et crée une force capable, en particulier, de déformer la membrane d'une cellule. En présence d'ADP, la concentration critique est identique aux 2 extrémités: il n'y a pas de tapis roulant ni de motilité.

## **II Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine**

La motilité cellulaire est basée sur le phénomène du tapis roulant de l'actine. Dans une cellule en mouvement les filaments s'allongent à une vitesse de l'ordre de 0,79  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Wang 1985) tandis qu'*in vitro*, cette valeur est proche de 0,03  $\mu\text{m}/\text{min}$  dans des conditions physiologiques. Nous verrons dans le paragraphe qui suit que la cellule est capable d'accélérer la vitesse de renouvellement des filaments d'actine pour permettre un mouvement rapide. Dans un lamellipode, le réseau de microfilaments est très dense mais pourtant, il est confiné dans une zone de quelques centaines de nanomètres de profondeur environ. Ce haut niveau d'organisation est rendu possible par la présence de centaines de protéines auxiliaires qui rendent possible la régulation spatiale et temporelle du cytosquelette. Ces protéines, aussi appelées *Actin Binding Proteins* représentent environ 25% des protéines cellulaires. Elles peuvent être isolées et étudiées au moyen d'approches biochimiques, génétiques et immunologiques. Dans ce chapitre, je décrirai les principales protéines qui régulent le tapis roulant. Elles sont la clé du contrôle par la cellule de son stock d'actine car elles modifient les taux de polymérisation des filaments à leurs extrémités en se liant à l'actine-G ou à l'actine-F. Il s'agit :

- ✓ des protéines de coiffe ou «capping proteins» (*capping protein*, gelsoline)
- ✓ des protéines séquestrantes (thymosine...)
- ✓ des protéines qui fragmentent les filaments ou «severing proteins »

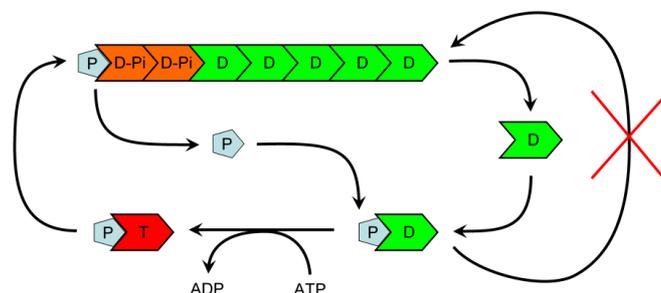
### **1°) La profiline et les protéines séquestrantes**

Dans les cellules au repos, la concentration d'actine non polymérisée peut être supérieure à 100  $\mu\text{M}$  (Bray and Thomas 1976) : cette concentration est donc de plusieurs ordres de grandeur plus élevée que la concentration critique de l'actine pure. Considérant les conditions de force ionique élevée et constante qui règnent dans la cellule, quasiment toute l'actine intracellulaire devrait être polymérisée. Or, seulement 40 % de l'actine intracellulaire se trouve sous forme filamenteuse ! Une grande partie de l'actine intracellulaire est en fait complexée avec des protéines dites séquestrantes. Découvertes dans les années 1970, les profilines forment une classe de petites protéines (12-15 kDa, 125-139 résidus) exprimées de manière abondante dans toutes les cellules eucaryotes (Sohn and Goldschmidt-Clermont 1994).

La profiline est indispensable aux premières étapes du développement chez la souris (Verheyen and Cooley 1994), (Witke et al. 2001), la *Drosophila* et *Dictyostelium* (Haugwitz et al. 1994). Elle est également indispensable à la formation de l'anneau contractile lors de la division cellulaire (Balasubramanian et al. 1994), (Haugwitz et al. 1994). Les cellules dans lesquelles l'expression de la profiline est inhibée ne peuvent plus développer de lamellipode et de fortes quantités de filaments d'actine s'accumulent dans le cytoplasme (Rogers et al. 2003). La profiline est la principale protéine se liant aux monomères d'actine du fait de la combinaison de son abondance ( $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  M) et de sa forte affinité pour l'actine G (Kd de l'ordre de 0,1  $\mu$ M pour l'actine-G-ATP et de 2  $\mu$ M pour l'actine-G-ADP).

Elle possède 2 fonctions selon la présence ou non de bouts barbés libres:

- Lorsque les bouts barbés sont bloqués par des protéines de coiffe (décrit plus loin), la profiline agit en protéine séquestrante: elle augmente la concentration d'actine non polymérisée en formant un complexe profiline-actine incapable de polymériser au bout pointu. Les complexes profiline-actine ne peuvent pas former de noyaux entre eux.
- En présence de bouts barbés libres, le complexe Actine-G-ATP-Profiline peut participer à la polymérisation mais uniquement au bout barbé (Pantaloni and Carlier 1993) (Figure A6). La profiline permet ainsi de maintenir dans la cellule un sous-ensemble d'actine-G-ATP qui peut être considéré comme une deuxième espèce d'actine monomérique polymérisable. Les complexes profiline-actine-G-ATP s'assemblent cependant avec une vitesse de 30% inférieure à celle d'un monomère d'actine-G non complexé. En présence de bouts barbés libres, le réservoir d'actine polymérisable est rapidement consommé, ce qui implique que la concentration de bouts barbés doit rester faible. La profiline agit également comme un facteur d'échange du nucléotide sur l'actine-G en accélérant la dissociation du Mg-ADP ((Mockrin and Korn 1980), (Perelroizen et al. 1995)).



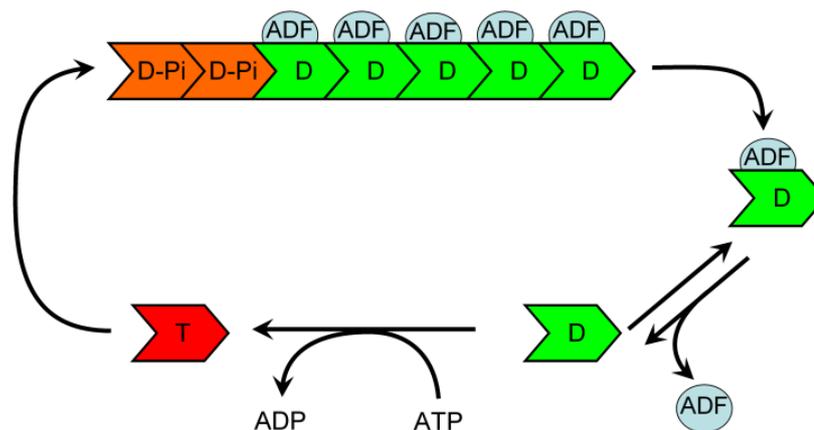
**Figure A6: Régulation de la polymérisation de l'actine par la profiline.**

*La profiline se fixe à l'extrémité barbée. Le complexe profiline-actine ainsi formé s'assemble exclusivement au bout barbé. La profiline doit se détacher pour permettre l'assemblage ultérieur de sous-unités. La profiline interagit avec l'actine-ADP qui dépolymérise au bout pointu et accélère l'échange du nucléotide, ce qui augmente la vitesse du treadmilling.*

## 2°) L'ADF

Les protéines de la famille ADF (*Actin Depolymerizing Factor*), aussi appelées cofilines, constituent une famille de protéines ubiquitaires de faible poids moléculaire (15-22 kDa). Chez les eucaryotes, l'ADF est impliqué dans de nombreux phénomènes comme l'endocytose, la cytodierèse, le développement embryonnaire et la motilité cellulaire (Carlier et al. 1997; Carlier et al. 1999). Dans un kératocyte en mouvement, l'ADF est localisé à l'arrière du lamellipode (Svitkina and Borisy 1999). En supprimant son expression, les cellules ne développent plus de lamellipode (Rogers et al. 2003). L'ADF se lie à l'actine-G et F de manière coopérative, préférentiellement dans leur forme ADP (Carlier et al. 1997). En se liant aux filaments, l'ADF impose une torsion supplémentaire de 5° par sous-unité qui déstabilise les contacts latéraux et/ou longitudinaux entre les sous-unités d'actine, ce qui favorise la dépolymérisation. (McGough and Chiu 1999). (Figure A7)

L'ADF accélère la vitesse de dissociation des sous-unités ADF-G-ADP au bout pointu d'environ 25 fois (Carlier et al. 1997). Cette réaction est l'étape limitante dans le cycle des réactions du treadmilling. Les monomères ADF-G-ADP échangent rapidement leur nucléotide contre de l'ATP, ce qui dissocie l'ADF de l'actine-G-ATP car son affinité est beaucoup plus faible que pour l'actine-ADP. (Ressad et al. 1998). L'ADF augmente la vitesse du tapis roulant de l'actine en augmentant le stock d'actine-G-ATP polymérisable (Ressad et al. 1999) jusqu'à l'établissement d'un nouvel état stationnaire où le flux d'association de l'actine G-ATP à l'extrémité barbée équilibre le flux de dépolymérisation de l'extrémité pointue.



**Figure A7: L'ADF/cofiline accélère le turnover des filaments d'actine.**

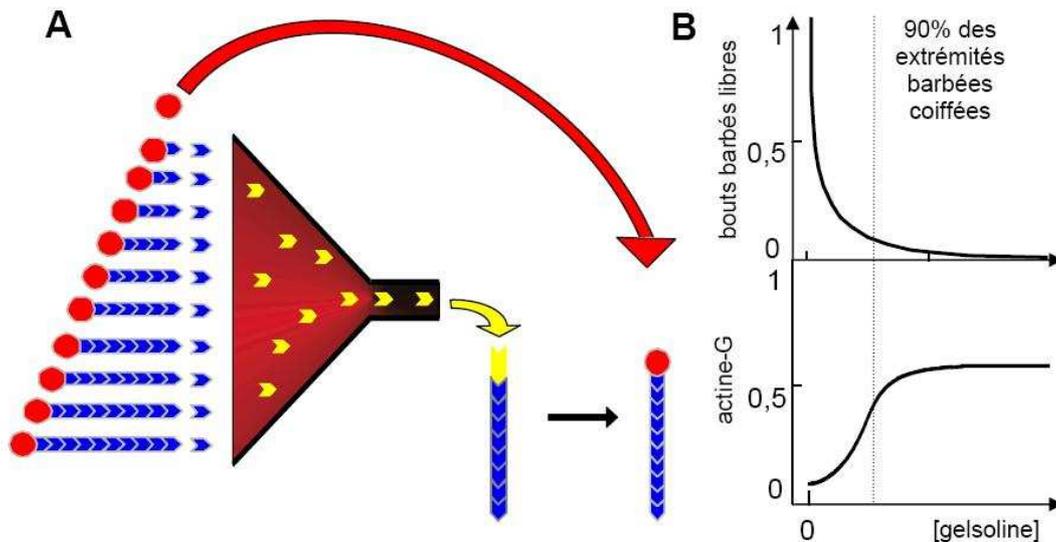
*L'ADF se fixe le long du filament, préférentiellement sur les sous-unités ADP. Ceci déstabilise le filament et accélère 25 fois la vitesse de désassemblage du complexe ADF-Actine-G-ADP à l'extrémité pointue. Après dépolymérisation, le complexe ADF-Actine-G-ADP se dissocie et l'actine-G échange son nucléotide ADP pour de l'ATP en large excès dans le milieu.*

### **3°) La gelsoline et les protéines de coiffe du bout barbé.**

Les protéines de coiffe sont essentielles pour les processus motiles (Hug et al. 1995; Loisel et al. 1999) ; (Sun et al. 1997). L'absence de protéines de coiffe entraîne un excès de ruffles et une accumulation de filaments d'actine à la membrane chez la *Drosophila*. Leur rôle est de bloquer l'assemblage au bout barbé. Les protéines de coiffe les plus étudiées sont la *Capping Protein* (CP) et la gelsoline. La *Capping Protein* se lie à l'extrémité barbée libre du filament d'actine tandis que la gelsoline opère par un mécanisme différent : en se fixant sur un côté du filament, elle déstabilise le filament en modifiant sa structure, ce qui le coupe. Enfin, la gelsoline se fixe à l'extrémité barbée générée par la coupure. Elle peut donc être considérée non seulement comme une protéine de coiffe, mais aussi comme une *severing protein* : elle fragmente les filaments, ce qui augmente leur nombre et diminue leur longueur moyenne.

La gelsoline est une protéine de taille moyenne (80 kDa) ubiquitaire et conservée chez les eucaryotes (Sun et al. 1999). En présence de  $Ca^{2+}$ , elle forme un complexe avec deux molécules d'actine-G (Coue and Korn 1985). C'est le complexe  $GA_2$  ainsi formé qui possède une activité coiffante du bout barbé. Son affinité pour le bout barbé est très élevée ( $K_d = 0.1$  nM) (Pollard et al. 2000), ce qui fait de la gelsoline la protéine de coiffe la plus efficace à ce jour. La gelsoline tire son nom de sa capacité à réaliser la transition Gel-Sol d'un réseau d'actine, c'est à dire solubiliser un gel d'actine filamenteuse. Les protéines de coiffe du bout barbé possèdent deux effets sur la dynamique de polymérisation de l'actine :

- Un filament dont le bout barbé est bloqué ne peut que se raccourcir à l'état stationnaire en perdant des sous-unités au bout pointu. Par conséquent, les protéines de coiffe du bout barbé ralentissent le renouvellement des filaments et la consommation d'énergie associée (ATP). Il a été estimé que si tous les bouts barbés d'une cellule étaient libres, le treadmilling résultant consommerait plus d'ATP que la cellule ne pourrait en produire.
- Bien que les protéines de coiffe du bout barbé abolissent la croissance au bout barbé des filaments auxquels elle se lie, elles accélèrent la croissance des filaments non coiffés dans une population à l'état stationnaire (Carlier et al. 1997). En effet, la dépolymérisation de tous les filaments (coiffés et non coiffés) doit être compensée par une croissance plus rapide des filaments non coiffés. Par conséquent il s'établit dans le milieu une concentration stationnaire plus élevée d'actine-G. Schématiquement, les sous-unités qui se dissocient des bouts pointus des filaments coiffés sont recyclées vers les bouts barbés des filaments non coiffés : il y a un effet d'entonnoir (figure A8).



**Figure A8: Les protéines de coiffe accélèrent la croissance aux extrémités barbées libres par un effet d'entonnoir.**

*A : La croissance des filaments coiffés par la gelsoline est bloquée à leur extrémité barbée et ils dépolymérisent par leur extrémité pointue. Les monomères ainsi libérés participent à l'élongation rapide des extrémités barbées des filaments non coiffés avant qu'ils soient coiffés à leur tour. B : Effet de la concentration des protéines de coiffe sur la concentration d'actine à l'état stationnaire. Lorsque 98% des extrémités barbées sont coiffées, la concentration d'actine-G à l'état stationnaire ( $C_{ss}$ ) est proche de la concentration critique du bout pointu.*

#### **4°) Effet synergique de l'ADF, de la profiline et des protéines de coiffe**

Dans la cellule, l'ADF, la profiline et les protéines de coiffe agissent en synergie pour accélérer le tapis roulant. La profiline et l'ADF agissent de manière complémentaire aux deux extrémités du filament pour accélérer le tapis roulant. L'ADF accélère la dissociation des monomères à l'extrémité pointue et la profiline dirige ces monomères exclusivement vers l'extrémité barbée puisque la profiline ne permet pas l'assemblage à l'extrémité pointue. Ainsi, la vitesse du tapis roulant augmente de 25 fois en présence d'ADF et de 125 fois en présence d'ADF et de profiline (Didry et al. 1998). D'autre part, le blocage de la majorité des extrémités barbées par les protéines de coiffe permet de diriger les monomères issus de la dépolymérisation due à l'ADF vers les quelques extrémités barbées libres, qui polymérisent donc plus vite. Ainsi, l'ADF, la profiline et les protéines de coiffe coopèrent pour augmenter la vitesse du tapis roulant des filaments en accélérant leur dépolymérisation à l'extrémité pointue et leur polymérisation à l'extrémité barbée (Carlier et al. 1997). Les protéines de coiffe sont recyclées après la dépolymérisation et coiffent les extrémités barbées libres.

### **III Régulation de la structure du réseau d'actine.**

Pour que le processus de tapis roulant soit maintenu à l'état stationnaire, il faut que le nombre d'extrémités barbées libres reste constant, ce qui nécessite de générer continuellement de nouveaux filaments : c'est le rôle du complexe Arp2/3. Le complexe Arp2/3 est un amplificateur puissant de la polymérisation d'actine qui possède un mécanisme unique : il branche des filaments ou des noyaux préexistants de sorte que la polymérisation devient une réaction autocatalytique. Il existe également d'autres protéines qui modifient la structure du cytosquelette d'actine : les "crosslinkers" ou "crosslinking proteins" créent des liaisons entre les filaments et modifient complètement les propriétés physiques et mécaniques du réseau. La plupart des crosslinkers sont contrôlés par la cellule au moyen d'autres protéines de régulation, ce qui permet des réorganisations très fines du cytosquelette.

#### **1°) Protéines contrôlant la structure du réseau d'actine**

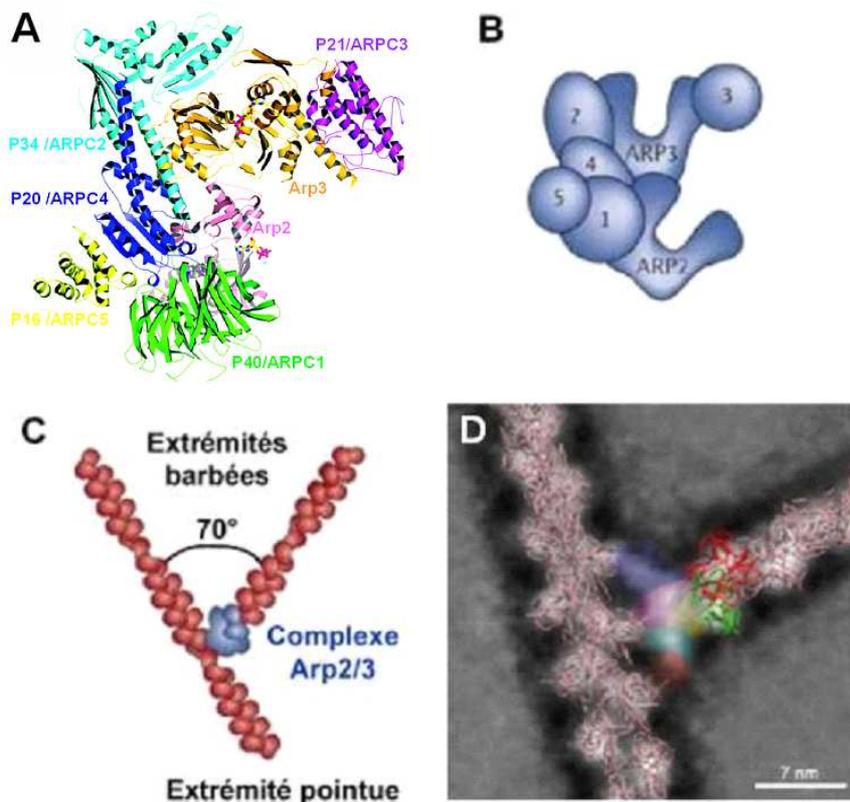
Outre le complexe Arp2/3, il existe de nombreuses autres protéines capables de modifier l'organisation spatiale et la réticulation du réseau d'actine. Ces protéines de pontage sont couramment appelées « crosslinkers » ou « agents réticulants ». Ce terme fait référence à la physique des polymères, où l'ajout de certains composants (comme le soufre pour le caoutchouc) conduit à la formation de pontages entre les chaînes et modifient complètement les propriétés mécaniques du matériau.

Voici quelques exemples de protéines de pontage. La villine comprend 6 domaines de répétition d'un domaine commun avec la famille des gelsolines qui lui confère une double activité de coiffe et de fragmentation. Elle regroupe les filaments en faisceaux grâce à son domaine HP (*Headpiece*) de liaison à l'actine-F. L'épine et les protéines de la famille forked ont en commun leur domaine C-terminal F/E (*Forked/Espin-homology domain*) qui leur permet de regrouper les filaments en faisceaux. L'épine possède une très forte affinité pour l'actine-F. L' $\alpha$ -actinine (100 kDa) forme un homodimère anti-parallèle qui pontre les filaments d'actine de manière assez lâche. La filamine (260 kDa) forme des dimères parallèles assez analogues à ceux de l' $\alpha$ -actinine. La présence de régions flexibles autorise le pontage orthogonal de filaments assez éloignés et favorise la formation de gel d'actine réticulé lâche où les filaments ont encore une assez grande liberté de mouvement. La fimbrine (68 kDa) possède quant à elle deux paires de domaines de liaison à l'actine qui lui permettent de structurer des réseaux assez denses.

## 2°) Le complexe Arp2/3

### a) Composition et structure du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 a été isolé en 1994 chez l'amibe *Acanthamoeba* (Machesky et al. 1994). Il a par la suite été identifié chez de nombreux eucaryotes et il est aujourd'hui considéré comme ubiquitaire. Arp2/3 est un assemblage stable de 220 kDa composé de sept polypeptides très conservés de la levure à l'homme (Welch et al. 1997). Le complexe a été nommé d'après les deux sous-unités Arp2 et Arp3 qui appartiennent à la famille des ARP (Actin Related Proteins) et qui possèdent des structures proches de celles de l'actine. La structure d'Arp2/3 bovin a été résolue à 2 Å en l'absence d'ATP (Robinson et al. 2001) et confirme les résultats obtenus antérieurement par pontage chimique (Mullins and Pollard 1999) et par reconstitution du complexe à partir de sous-unités recombinantes (Gournier et al. 2001). En 2004, Nolen et collaborateurs ont publié des structures d'Arp2/3 en complexe avec de l'ATP ou de l'ADP (Figure A9)



**Figure A9 : Structure du complexe Arp2/3.**

**A:** Structure du complexe Arp2/3 bovin lié à du  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP (Nolen et al. 2004)

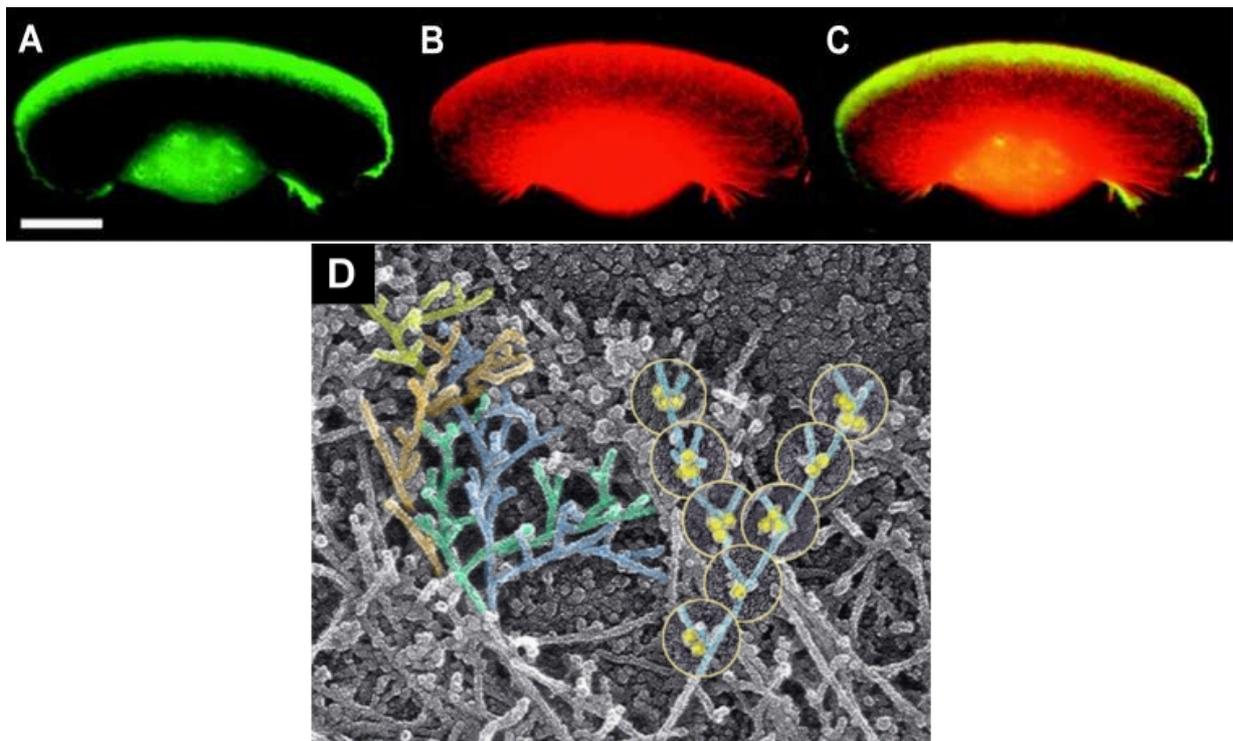
**B:** Représentation de l'organisation des différentes sous-unités du complexe Arp2/3.

**C:** Représentation d'un filament branché : les branches mère et fille forment un angle de  $70^\circ$

**D :** Modèle de la structure du complexe Arp2/3 à partir d'observations en cryo-électromicroscopie. Les deux premières sous-unités de la branche fille (en rouge et en vert) ont été attribuées à Arp2 et Arp3 et le reste de la densité électronique aux autres sous-unités.

### ***b) Localisation du complexe Arp2/3***

Dans les cellules de mammifères, le complexe Arp2/3 est localisé préférentiellement au bord avant du lamellipode des cellules motiles comme les fibroblastes ((Welch et al. 1997), (Machesky et al. 1997)) et les kératocytes (Svitkina and Borisy 1999) (figure A10-A à C). Le recrutement d'Arp2/3 au bord avant du lamellipode est induit par le facteur de croissance PGDF (Machesky et al. 1997). En marquant le complexe à l'or colloïdal, Svitkina et Borisy ont pu observer le réseau branché de filaments d'actine par microscopie électronique, et situer le complexe Arp2/3 à la jonction des branches (figure A10-D)



**Figure A10 : Localisation du complexe Arp2/3 dans un kératocyte en mouvement, à l'échelle de la cellule et du réseau d'actine (Svitkina and Borisy 1999)**

*A, B : Localisation par immunofluorescence du complexe Arp2/3 (en vert) et de l'actine (en rouge) au bord avant du lamellipode. C : Colocalisation du complexe Arp2/3 et de l'actine*  
*D : Micrographie du réseau d'actine branché par le complexe Arp2/3 au bord avant du lamellipode. Arp2/3 est marqué par des anticorps couplés à l'or colloïdal (en jaune).*

Les résultats sur le complexe Arp2/3 en biologie cellulaire ont conforté l'hypothèse qu'il joue un rôle dans de nombreux processus de motilité cellulaire. Par immuno-localisation ou par expression de sous-unités marquées à la GFP, le complexe a également pu être localisé dans les coupes phagocytiques (May et al. 2000) et les cônes de croissances neuronaux (Goldberg et al. 2000). Chez *Acanthamoeba*, le complexe Arp2/3 est localisé dans le cortex cellulaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le complexe Arp2/3 est localisé au niveau des *patches* d'actine corticaux (Madania et al. 1999), (Pruyne and Bretscher 2000).

Le complexe Arp2/3 est également associé à la comète des bactéries *Listeria* et *Shigella* (Welch et al. 1997), (Gouin et al. 1999) (voir plus loin). Selon des expériences de disruption de gènes menées dans *S. cerevisiae*, la délétion complète du complexe Arp2/3 est létale (Winter et al. 1999). Une étude dans *Drosophila melanogaster* a montré que des mutations de perte de fonction dans les gènes codant pour Arp3 et Arp1 conduisent à la mort avant l'âge adulte (Hudson and Cooley 2002). L'inactivation du complexe Arp2/3 par interférence à l'ARN est létale chez *C. Elegans* (Sawa et al. 2003).

### **3°) Activation du complexe Arp2/3 par la signalisation.**

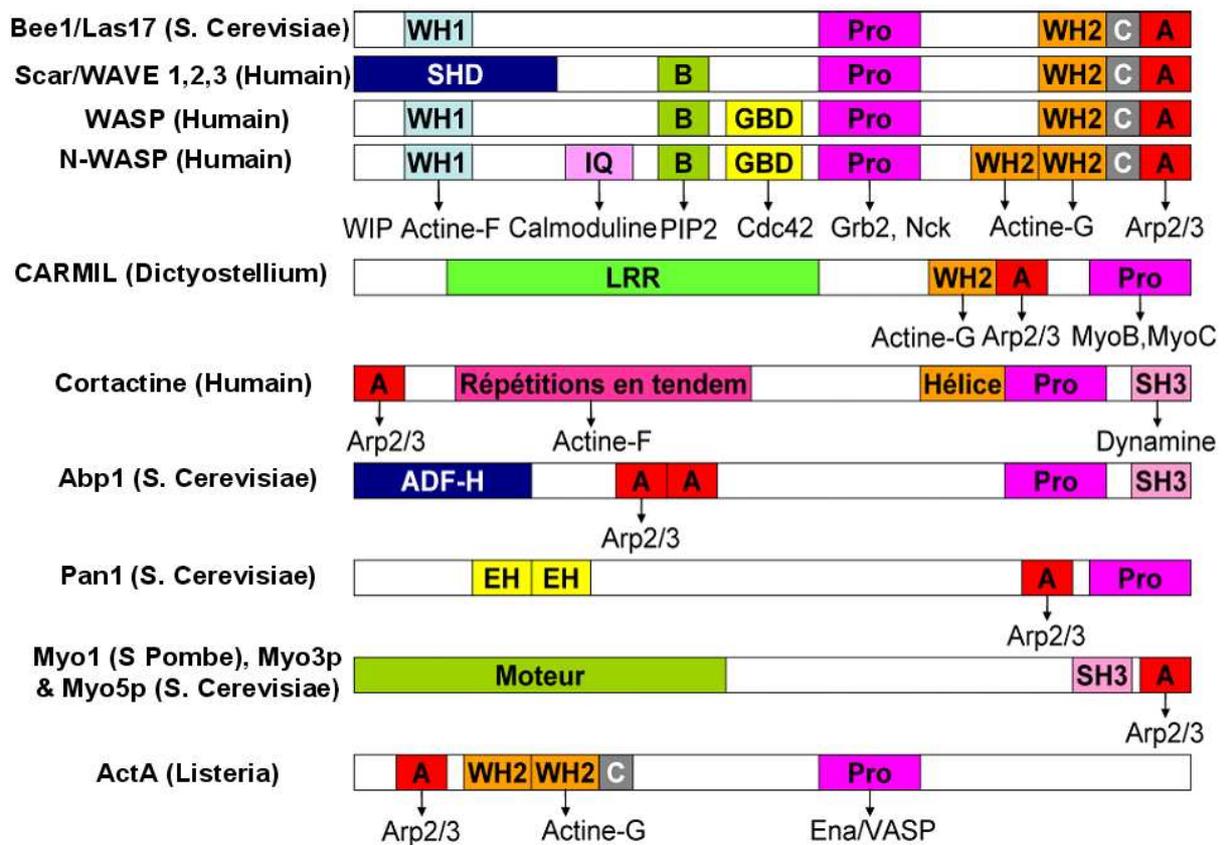
Le complexe Arp2/3 purifié est constitutivement inactif : il n'a aucune activité intrinsèque *in vitro*. Pour stimuler la polymérisation de l'actine, il doit être activé par les protéines de la famille WASP/WAVE/Scar. Il est à mentionner qu'outre ces protéines, il existe d'autres activateurs connus du complexe Arp2/3 tels que la cortactine et Abp1p (Olazabal and Machesky 2001). Peu de choses sont connues au sujet de la façon dont les différents activateurs d'Arp2/3 sont coordonnés pour orchestrer la polymérisation et l'organisation de l'actine au cours des différents processus dans lesquels elle est impliquée. Comprendre comment l'activité du complexe Arp2/3 est régulée dans la cellule et identifier de nouveaux activateurs d'Arp2/3 qui connectent les différentes voies de signalisation est un objectif de tout premier ordre dans la recherche sur le cytosquelette l'actine.

Parmi les protéines de la famille WASP/WAVE/Scar, on compte :

- Le groupe des protéines **Scar/WAVE** (1, 2, et 3) (*suppressor of c-AMP receptor mutation / WASP family verproline homologous protein 1, 2 et 3*). Les protéines apparentées WAVE sont les effectrices de Rac et de la protéine adaptatrice Nck. La protéine WAVE1 est impliquée dans la formation de ruffles en réponse à Rac1 mais ces deux protéines n'interagissent pas directement (Miki et al. 1998).
- **WASP** (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*). En 1994, Derry et collaborateurs isolent le gène dont les mutations sont à l'origine du syndrome de Wiskott-Aldrich et provoquent un déficit immunitaire (diminution de nombre et du volume des plaquettes, de l'efficacité de la phagocytose chez les macrophages (Lorenzi et al. 2000), dysfonctionnement dans la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T. Le produit de ce gène est la protéine WASP, qui est exprimée seulement dans les cellules de la lignée hématopoïétique ((Higgs and Pollard 1999) (Derry et al. 1994).

- **N-WASP** (*Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrom Protein*). Bien que la protéine N-WASP ait été considérée comme un homologue neuronal de la protéine WASP, N-WASP est en réalité exprimée dans tous les tissus. N-WASP est une protéine de 65kDa ubiquitaire chez les mammifères qui possède des homologues chez la levure (*Las17p*) et la *Drosophile* (*WASP*)

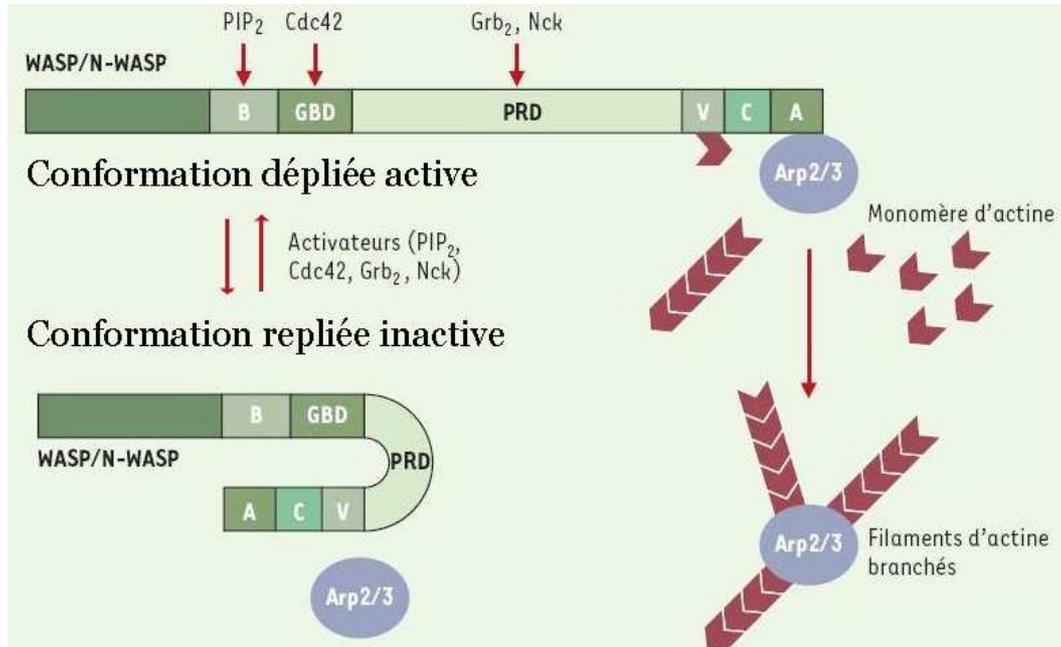
Les protéines de la famille WASP/WAVE/Scar et leurs homologues relient différentes voies de signalisation au complexe Arp2/3 grâce à plusieurs domaines (Figure A11) :



**Figure A11 : Représentation schématique des activateurs du complexe Arp2/3**

**WH1**: domaine d'homologie à WASP (*WASP Homology 1*), qui fixe la protéine WIP ;  
**B** : domaine basique qui fixe le PIP2, **GBD** : domaine de fixation à Cdc42 (*G-protein Binding Domain*) **Pro** : domaine riche en proline, **WH2** : domaine d'homologie à WASP2 (*WASP Homology 2*), qui fixe l'actine monomérique **C** : domaine d'homologie à la cofiline aussi appelé domaine central ; **A** : domaine acide qui fixe le complexe Arp2/3, **SHD** : domaine d'homologie à Scar, **SH3** : domaine d'homologie à Src, **ADF-H** : domaine d'homologie à l'ADF (*ADF Homology*), **EH** : domaine d'homologie à l'epsine (*Espin Homology*), **CC** : domaine coil-coil. **PRD** : domaine central riche en proline (*Proline Rich Domain*) qui fixe les domaines SH3 qu'on trouve en particulier dans les protéines telles que Grb2 et Nck.

Il a été montré que N-WASP était la cible directe de Cdc42 lors de la formation des filopodes dans les fibroblastes (Miki et al. 1998). Parmi les différents ligands capables de réguler l'activité de N-WASP, Cdc42 et le PIP2 sont ceux dont le mécanisme d'activation a été le mieux caractérisé. Tandis que le domaine C-terminal VCA (ou WA) isolé active Arp2/3 constitutivement (Rohatgi et al. 1999), la protéine N-WASP entière est un activateur modeste du complexe Arp2/3. Une interaction entre les domaines GBD et WA (Miki et al. 1998) (Abdul-Manan et al. 1999) induit un repliement auto-inhibé de N-WASP (Kim et al. 2000) qui empêche la fixation et l'activation du complexe Arp2/3 (Rohatgi et al. 1999). La fixation de Cdc42 au domaine GBD (Miki et al. 1998), du PIP2 au domaine basique, ou la fixation coopérative de Cdc42 et du PIP2 diminue l'affinité entre les domaines GBD et WA ((Egile et al. 1999), (Rohatgi et al. 1999), (Higgs and Pollard 1999) et déplace l'équilibre conformationnel de la forme fermée inactive vers la forme ouverte active. L'ouverture de la protéine démasque le domaine WA, ce qui permet de recruter et d'activer le complexe Arp2/3 (Figure A12). Le domaine C-terminal VCA de WASP a été identifié comme étant suffisant pour activer Arp2/3. Il est à noter que les protéines de la famille WAVE ne contiennent pas de domaine GBD : elles ne sont pas auto-inhibées et ne sont pas des cibles directes des Rho-GTPases, (Eden et al. 2002)).



**Figure A12: Mécanisme d'activation des protéines de la famille WASP par Cdc42 & PIP2**  
*N-WASP est en équilibre conformationnel avec une forme ouverte active et une forme fermée inactive dans laquelle le domaine WA est masqué. PIP2 et Cdc42 se fixent respectivement au domaine basique (B) et au domaine de fixation des protéines G (GBD) de N-WASP/WASP pour stabiliser sa forme ouverte active. Le domaine WA est démasqué et active Arp2/3 qui génère des filaments d'actine par branchement.*

La capacité de N-WASP à lier différents facteurs protéiques et lipidiques par l'intermédiaire de ses différents domaines régulateurs lui confère un rôle de centre d'intégration qui connecte les cascades de signalisation et le cytosquelette d'actine. Par exemple, son domaine basique établit une interaction avec le PIP2 (Rohatgi et al. 2000), son domaine GBD lui permet d'interagir avec la petite protéine G Cdc42 (Miki et al. 1998), son domaine riche en proline avec les domaines SH3 de protéines liées aux récepteurs tyrosine kinase telles que Nck et Grb2 (Rivero-Lezcano et al. 1995; Carlier et al. 2000). N-WASP interagit avec de nombreuses autres protéines (Takenawa and Miki 2001).

Il est intéressant de noter que les fibroblastes déficients en N-WASP peuvent néanmoins développer des lamellipodes et des filopodes. Ainsi, Nakagawa et collaborateurs ont suggéré que les activateurs physiologiques d'Arp2/3 dans la protrusion du lamellipode seraient d'autres protéines de la famille WAVE/Scar plutôt que N-WASP (Nakagawa et al. 2001). Bien que de nouvelles voies de signalisation soient couramment découvertes et remettent en question les conclusions tirées jusqu'alors, il est communément admis que Cdc42 et Rac1 jouent respectivement un rôle dans la formation des filopodes et des lamellipodes, tandis que RhoA intervient essentiellement dans la formation des fibres de tension et des plaques d'adhérence. Pourtant, Tomasevic et collaborateurs ont montré que Rac1 serait un bien meilleur activateur de N-WASP que Cdc42 (Tomasevic et al. 2007). Ces résultats remettent en cause un « dogme » jusque là bien établi selon lequel la formation de lamellipodes serait induite par les protéines de la famille WAVE sous contrôle de Rac tandis que N-WASP jouerait plutôt un rôle dans la formation de filopodes sous contrôle de Cdc42 et ne serait pas impliqué dans la formation de lamellipodes.

#### **4°) Mécanisme de nucléation et branchement par Arp2/3**

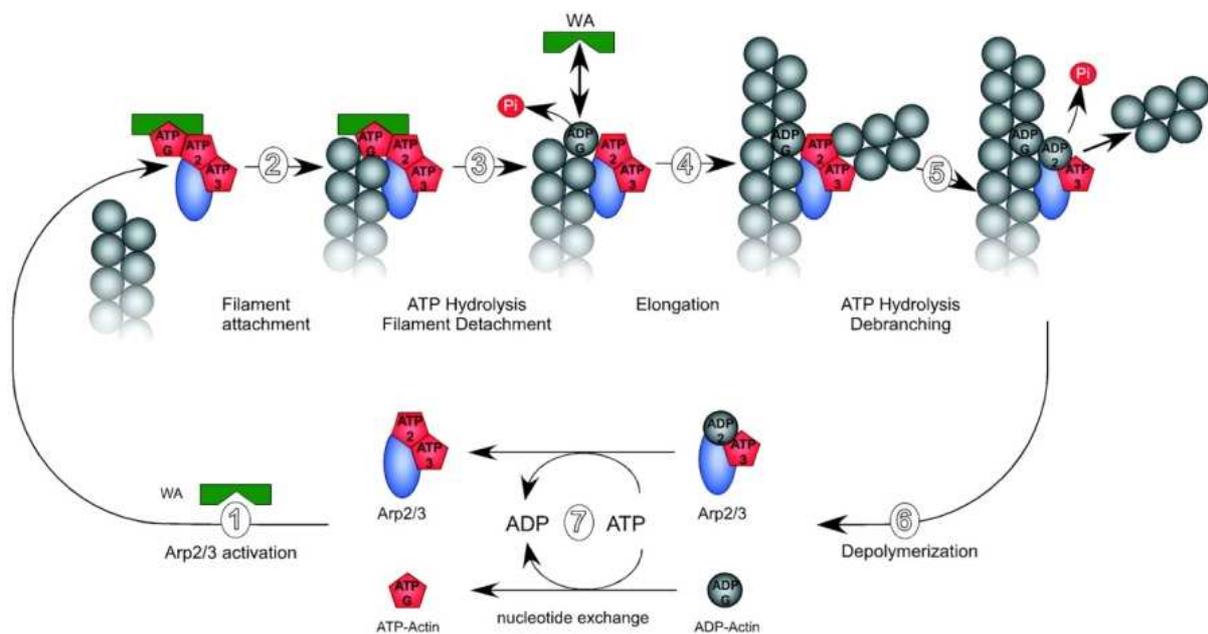
Mullins et collaborateurs ont utilisé la microscopie électronique pour montrer que les filaments formés en présence du complexe Arp2/3 sont branchés en Y (Figures A9 et A10). Des expériences d'immuno-localisation en microscopie électronique du complexe Arp2/3 dans le lamellipode d'un kératocyte confirment que le complexe Arp2/3 est localisé au point de branchement de deux filaments dont les extrémités barbées font face à la membrane plasmique (Svitkina and Borisy 1999) (Figure A10-D). Blanchoin et collaborateurs ont démontré que le complexe Arp2/3 activé génère de nouveaux filaments (Blanchoin et al. 2000). L'analyse des cinétiques de polymérisation de l'actine en filaments branchés montre que ce phénomène est auto-catalytique, c'est à dire qu'Arp2/3 génère de nouveaux filaments à partir de filaments d'actine préexistants (Pantaloni et al. 2000).

VCA se lie à un monomère d'actine via son (ou ses) domaine(s) WH2 et à Arp2/3 par le domaine CA. Le complexe ainsi formé interagit avec un filament mère avant d'initier la formation d'un filament fille. L'unité de branchement ne serait donc pas le complexe Arp2/3 seul mais plutôt un complexe ternaire formé du complexe Arp2/3, du domaine WA de la protéine N-WASP et d'une actine-G fixée à WA. En absence de données structurales, il a été proposé que ce complexe ternaire possède la même structure qu'un noyau d'actine (dans lequel les sous-unités Arp2 et Arp3 joueraient le rôle de deux actines pour interagir avec l'actine fixée à WH2). Ce complexe nucleus se fixerait sur le filament mère préexistant pour initier un nouveau filament (Pantaloni et al. 2000). Le complexe WA-actine-G aurait alors la même fonction que le complexe profiline-Actine-G qui participe à la polymérisation à l'extrémité barbée (Egile et al. 1999). Un désaccord subsiste néanmoins sur le mécanisme d'interaction du complexe Arp2/3 activé avec un filament pour initier un branchement : le complexe actine-G-VCA-Arp2/3 se fixe soit sur le côté des filaments préexistants, soit à l'extrémité barbée de filaments.

Sur la base d'observation de filaments d'actine branchés en microscopie à fluorescence, Amann et Pollard ont proposé que le branchement se produit sur le côté du filament (Amann and Pollard 2001). L'observation du branchement en temps réel par TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) (Amann and Pollard 2001) indique que le branchement aurait lieu à proximité de l'extrémité barbée (Blanchoin et al. 2000). Ces résultats ont été confirmés par Ichetovkin et collaborateurs, qui ont montré que la capacité des filaments à former de nouvelles branches diminue avec l'âge des filaments et que le branchement se produisait préférentiellement au niveau des sous-unités qui portent de l'ADP-Pi ou de l'ATP (Ichetovkin et al. 2002). Plus récemment Mahaffy et Pollard ont montré que la nature du nucléotide en complexe avec l'actine n'affectait pas le branchement mais que les branches étaient d'un ordre de grandeur plus stables lorsque le filament mère est dans l'état ATP ou ADP-Pi que dans l'état ADP (Mahaffy and Pollard 2006)

Le modèle de branchement par le côté des filaments a été contesté par Pantaloni et collaborateurs qui proposent un mécanisme de branchement par le bout barbé (Pantaloni et al. 2000) (Figure A13). Les auteurs montrent que les filaments dont les extrémités barbées sont bloquées ne peuvent pas brancher et que l'activité de nucléation auto-catalytique des filaments d'actine par le complexe Arp2/3 ne dépend pas de la masse d'actine-F mais du nombre d'extrémités barbées.

Par ailleurs, le modèle du branchement par le coté du filament implique que les branches filles soient toujours plus courtes que les branches mères. Or, les observations de corrélation des longueurs des branches filles et mères montrent que leur taille est statistiquement égale (Pantaloni et al. 2000). Récemment, des simulations de formation d'un réseau polarisé de filaments branchés suggèrent que les deux modèles peuvent coexister mais que la majorité des branches pourraient être formées par le coté *in vitro*, mais par l'extrémité barbée dans la cellule (Carlsson et al. 2004).



**Figure A13: Modèle de branchement/débranchement des filaments d'actine par l'extrémité barbée.**

1 : Activation d'Arp2/3 par formation d'un complexe Actine-G-WA-Arp2/3. 2 : Association d'un filament au complexe ternaire. 3 : L'hydrolyse de l'ATP sur l'actine après son incorporation dans la branche déstabilise l'interaction avec WA et conduit au détachement de la jonction branchée. 4 : Elongation des filaments mère et fille. 5 : L'hydrolyse de l'ATP sur Arp2 au niveau de la branche cause le débranchement. 6 : Dépolymérisation des filaments. 7 : L'échange de nucléotide sur l'actine-G et le complexe Arp2/3 permet leur recyclage (Le Clainche et al. 2003)

En conclusion, les études sur le mécanisme de branchement de filaments n'ont jusqu'à maintenant pas donné de réponse claire et définitive sur le mécanisme précis de la nucléation de l'actine et de son organisation par le complexe Arp2/3. Il reste par exemple à comprendre le mécanisme moléculaire par lequel le complexe Arp2/3 interagit avec son activateur et si l'incorporation à lieu dans le filament mère ou fille.

## **IV Motilité cellulaire et changements de forme liés à l'actine.**

De nombreux processus de motilité cellulaire mènent à un changement de forme local, surtout à la déformation de la membrane plasmique. Ces différents processus mettent en jeu deux types d'organisation du cytosquelette d'actine:

- Des réseaux de filaments entrelacés fortement branchés
- Des faisceaux de filaments non branchés (parallèles ou antiparallèles)

### **1°) Structures de filaments d'actine**

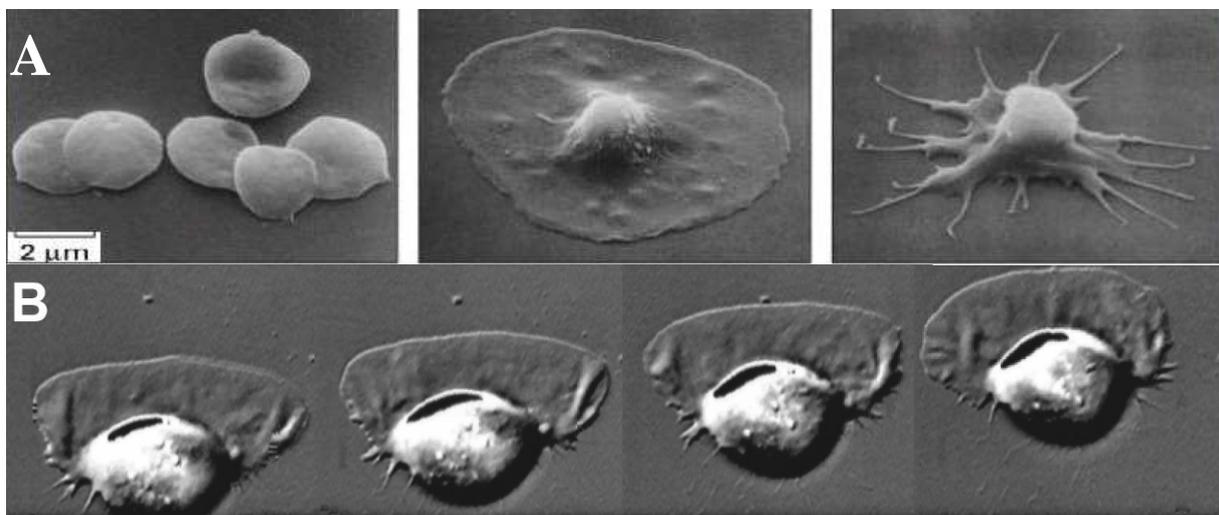
#### **a) Filaments structurés en faisceaux antiparallèles et parallèles.**

Certaines structures présentent une rigidité qui nécessite que les filaments qui la soutiennent soient associés. Les faisceaux contractiles formés de faisceaux anti-parallèles se trouvent essentiellement dans les sarcomères, la ceinture d'adhérence, l'anneau contractile mitotique et les fibres de stress. Le mécanisme de contraction des faisceaux repose sur le glissement, entraîné par l'hydrolyse de l'ATP, des filaments d'actine en interaction avec la myosine-II. On trouve des faisceaux parallèles dont la fonction principale est le maintien de la structure plutôt que leur aptitude à générer une contraction. On peut citer les microvillosités des cellules épithéliales de la bordure en brosse intestinale, les stéréocils ou encore les poils neurosensoriels de *D. melanogaster*. Ces structures correspondent à des protrusions membranaires maintenues par un ou plusieurs faisceaux de filaments d'actine parallèles.

Les filopodes ou microspicules sont des pseudopodes très allongés plus petits que les lamellipodes. Ils sont présents dans de nombreux types de cellules au repos ou en mouvement. Ils servent surtout à l'exploration de l'environnement cellulaire. De nombreux filopodes font partie du cône de croissance du neurite en développement. Les filopodes sont observés au bord avant du lamellipode des cellules en migration, dans les cônes de croissances neuronaux, dans les vaisseaux sanguins en croissance (Gerhardt et al. 2003), ou encore au niveau de la synapse immunologique (Dustin and Cooper 2000).

### **b) Filaments structurés en réseaux branchés**

Bien qu'on trouve des réseaux de filaments branchés au niveau du réseau sous-membranaire d'actine corticale, ce type d'organisation se trouve essentiellement au bord avant des cellules qui se déplacent ou changent de forme, souvent suite à un signal extracellulaire. (Figure A14). Les cellules motiles forment dans les fronts de migration des structures spécialisées, appelées lamellipodes, qui sont des grands pseudopodes plats. Cette région est en général plus large que le corps cellulaire et possède une épaisseur de plusieurs centaines de nanomètres, d'où sont exclus les organites (figure A14)



**Figure A14: Les changements de forme des cellules s'accompagnent de la formation de protrusions cellulaires par réorganisation du cytosquelette d'actine.**

*A : L'activation des plaquettes fait suite au remodelage de leur cytosquelette d'actine et la formation de protrusions membranaires B : Déplacement d'un kératocyte (V. Small)*

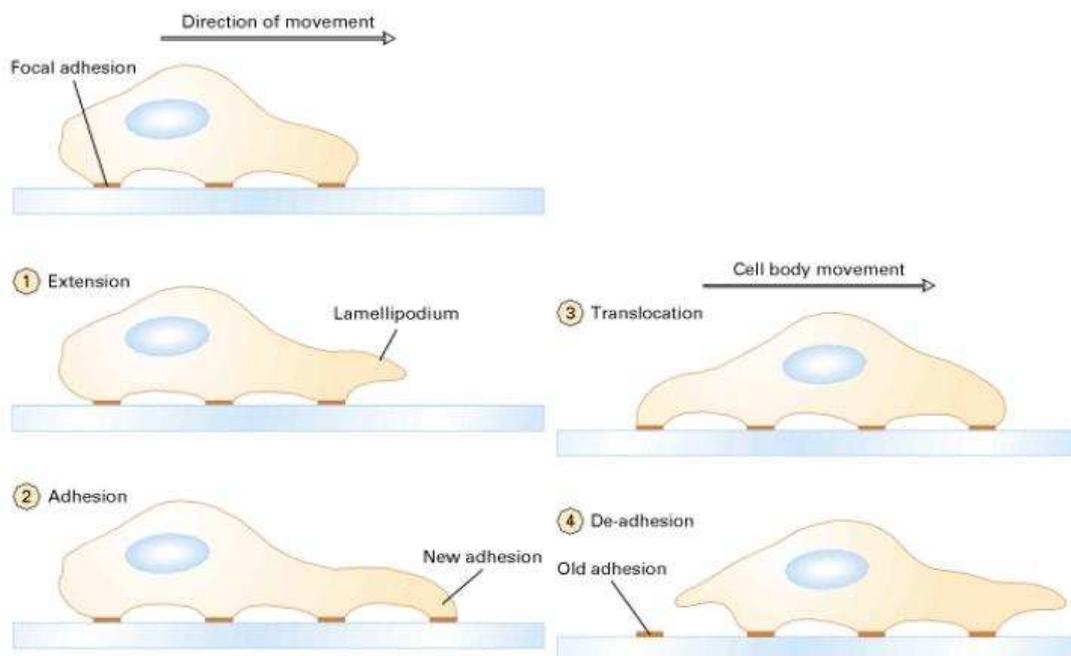
### **2°) Motilité cellulaire.**

La migration cellulaire a un rôle primordial au sein des organismes eucaryotes pluricellulaires. De nombreuses cellules sont capables de migrer individuellement ou en groupe. Les cellules acquièrent la capacité de migrer très tôt au cours du développement de l'embryon chez les vertébrés, par exemple lors de la gastrulation, une étape essentielle au développement. Ces processus de migration cellulaire ont lieu tout au long de l'embryogenèse. Les cellules des crêtes neurales sont remarquables par leur capacité à migrer sur de longues distances. Les mêmes phénomènes migratoires interviennent lors de la croissance axonale, pour permettre aux neurones d'établir des synapses jusqu'à plusieurs centimètres de leur point de départ.

Bien que la migration des cellules soit moins importante chez l'adulte, de nombreuses cellules resteront motiles. Par exemple, les lymphocytes, les macrophages et les fibroblastes continueront à se déplacer au cours de la vascularisation, où les cellules endothéliales migrent pour former un réseau de capillaires lors de l'angiogenèse. Dans l'inflammation, les cellules immunitaires migrent vers les sites infectés pour détruire les bactéries. Dans la cicatrisation, les cellules migrent pour restaurer un tissu endommagé (Cicchetti et al. 2002), (Bearer and Satpute-Krishnan 2002).

### a) Processus de migration

La migration cellulaire peut être divisée en quatre processus distincts (cinq si on compte la polarisation de la cellule) qui se déroulent en réalité simultanément de manière coordonnée (Figure A15) : protrusion du bord avant de la cellule ; adhésion de la partie avancée à la surface ; rétraction du corps cellulaire ; dé-adhésion du bord arrière de la surface.



**Figure A15 : les différentes étapes de la locomotion cellulaire**

**1** : La polymérisation insertionnelle d'actine contre la membrane génère une force suffisante pour déformer la membrane. L'extension du lamellipode assure une large surface de contact avec la matrice extracellulaire (substrat). **2** : L'adhésion du lamellipode au substrat est médiée par des protéines membranaires de la famille des intégrines. L'adhésion s'accompagne de la formation de complexes focaux d'adhésion (structures qui contiennent de l'actine-F sous forme de faisceaux). L'adhésion est caractérisée par des forces considérables de l'ordre du nN qui constituent une composante limitante de la motilité cellulaire. **3** : Les forces de contraction générées par l'interaction entre la myosine II et l'actine induisent le mouvement du corps cellulaire vers l'avant (translocation) **4** : Le détachement des adhésions à l'arrière de la cellule repose sur la rupture des liaisons entre les intégrines et leur ligand, mais peut aussi être médiée par la sécrétion d'enzymes hydrolysant des composants de la matrice extracellulaire.

### **b) Rôle de la polymérisation d'actine dans les processus motiles**

Le lamellipode contient de grandes quantités d'actine-F qui apparaît organisée en réseaux formés de filaments courts ramifiés en microscopie électronique (figure A10-D). La compréhension du rôle de l'actine dans les phénomènes motiles tels que l'avancée du lamellipode a fait un grand pas grâce aux expériences de Wang en 1985. Il a micro-injecté de l'actine marquée à la rhodamine dans un fibroblaste, puis l'a photoblanchie par rayonnement laser au bord d'un microspicule ou d'un lamellipode. En suivant l'évolution du recouvrement de la fluorescence, il a pu en déduire que l'actine était incorporée dans les filaments à l'avant du lamellipode et dépolymérisait à l'arrière (Wang 1985). Les filaments anciennement formés qui se trouvent à l'arrière du front de migration dépolymérisent, les monomères d'actine sont réincorporés dans de nouveaux filaments près de la membrane plasmique. Ce phénomène est strictement contrôlé et contribue à la production de forces qui permettent la motilité cellulaire.

Il est admis que l'énergie chimique qui assemble et organise les filaments d'actine est transformée en énergie mécanique capable de générer une protrusion en déformant le bord avant de la cellule. Le lamellipode tire la cellule motile en avant par sa croissance continue, qui repose sur la polymérisation dirigée du réseau de filaments d'actine contre la membrane plasmique. La migration de la cellule nécessite un couplage de la protrusion à l'adhésion : l'actine exerce aussi des forces de traction via des câbles (les fibres de stress) sur les points d'ancrage (les adhésions focales). Le mouvement de reptation dépend non seulement de l'actine, mais aussi de la myosine II, qui produit des forces de contraction en se déplaçant le long de filaments d'actine.

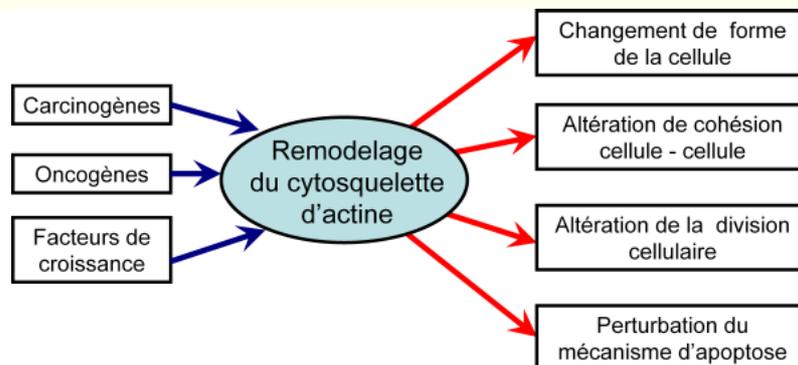
Sur les bases de la connaissance biochimique de l'actine, on a longtemps pensé que l'avancée du lamellipode ou l'extension de filopodes devait se dérouler à la même vitesse que la polymérisation de l'actine. Récemment, l'amélioration des techniques d'observation comme la qFSM (*quantitative Fluorescent Speckle Microscopy*) a permis de mesurer le turnover de filaments individuels au sein du lamellipode (Waterman-Storer and Danuser 2002). Cette technique a montré que deux réseaux distincts de filaments co-existent et sont caractérisés par différents turnovers. Au bord avant du lamellipode, dans une zone de 1 à 3  $\mu\text{m}$ , un réseau de filaments branchés a un turnover rapide. La lamella est une région située en arrière du lamellipode dans le turnover des filaments d'actine est plus lent. La polymérisation d'actine se fait donc à plusieurs vitesses dans une même cellule, ce qui signifie que différentes machineries protéiques agissent de concert. Le mécanisme de coordination n'est pas connu.

### c) Actine et cancer

Nous avons vu que les cellules eucaryotes sont dotées de propriétés motiles. Le dérèglement de ces propriétés motiles peut donc avoir des conséquences dramatiques. Ainsi, dans le cas du cancer, les cellules tumorales perdent leur capacité à réguler la balance entre adhésion et locomotion. L'augmentation dérégulée de leur mobilité leur permet de s'échapper du centre de la tumeur initiale pour former des métastases et envahir l'organisme. C'est la capacité de s'étendre à d'autres tissus et d'autres organes qui fait du cancer une maladie potentiellement mortelle : le développement de métastases est la première cause de mortalité des patients atteints d'un cancer (Woodhouse et al. 1997).

Le phénomène de métastase (du grec « *changer de place* ») est une série complexe d'étapes au cours desquelles des cellules cancéreuses quittent le site originel (tumeur primaire) et migrent vers d'autres parties du corps en utilisant le système lymphatique et/ou le système sanguin. Il existe maintenant de solides arguments pour penser que les stades ultimes de la cancérisation épithéliale sont marqués par la perte des jonctions intercellulaires, associée à la perte de la morphologie épithéliale et à l'acquisition de propriétés de mobilité cellulaire. Il a été montré que les cellules cancéreuses sont capables de briser la matrice extracellulaire qui sépare la tumeur des tissus voisins et de s'évader de la tumeur primaire.

Tout comme l'augmentation de la mobilité des cellules malignes leur permet de s'échapper du centre de la tumeur initiale pour former des métastases et envahir l'organisme, les processus de vascularisation des tumeurs, de reconnaissance des cellules tumorales par des lymphocytes T sont tous engendrés par la polymérisation dirigée de l'actine. Le cytosquelette d'actine est donc une cible de choix pour les molécules thérapeutiques visant à inhiber le mouvement non contrôlé des cellules cancéreuses. Il est donc essentiel d'accroître nos connaissances sur les mécanismes gérant la mobilité et les propriétés invasives des cellules cancéreuses avec pour objectif de développer de nouvelles approches thérapeutiques.



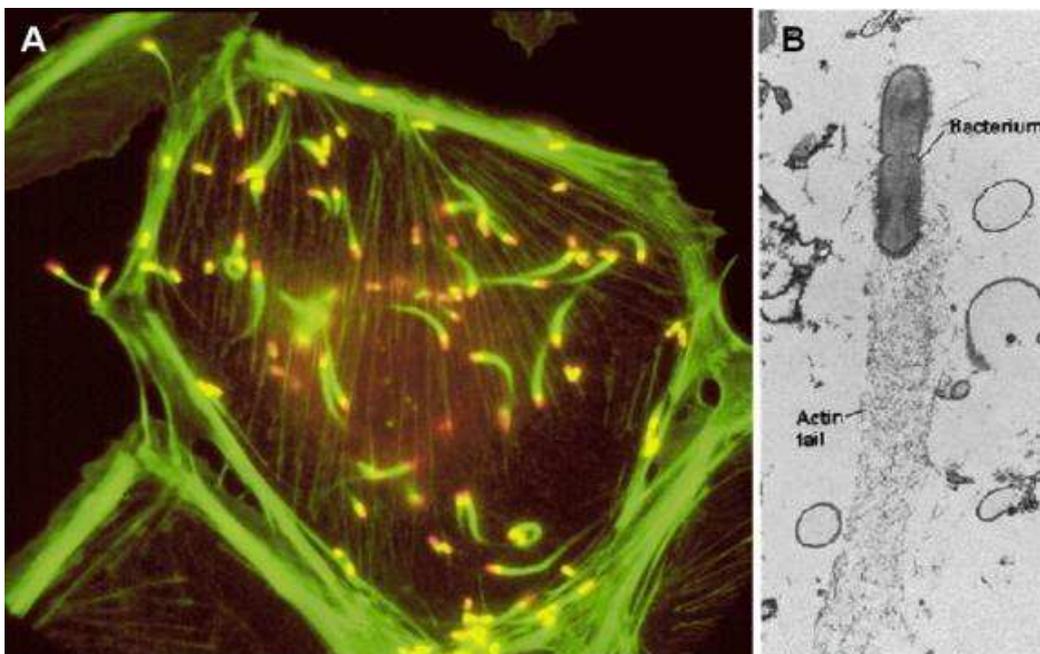
**Figure A16 : Le remodelage du cytosquelette d'actine est impliqué de différentes manières dans les mécanismes de cancérisation.**

# Partie B: Systèmes modèles de la motilité

## I Certains pathogènes court-circuitent la signalisation qui mène au complexe Arp2/3.

### 1°) Propulsion par polymérisation d'actine.

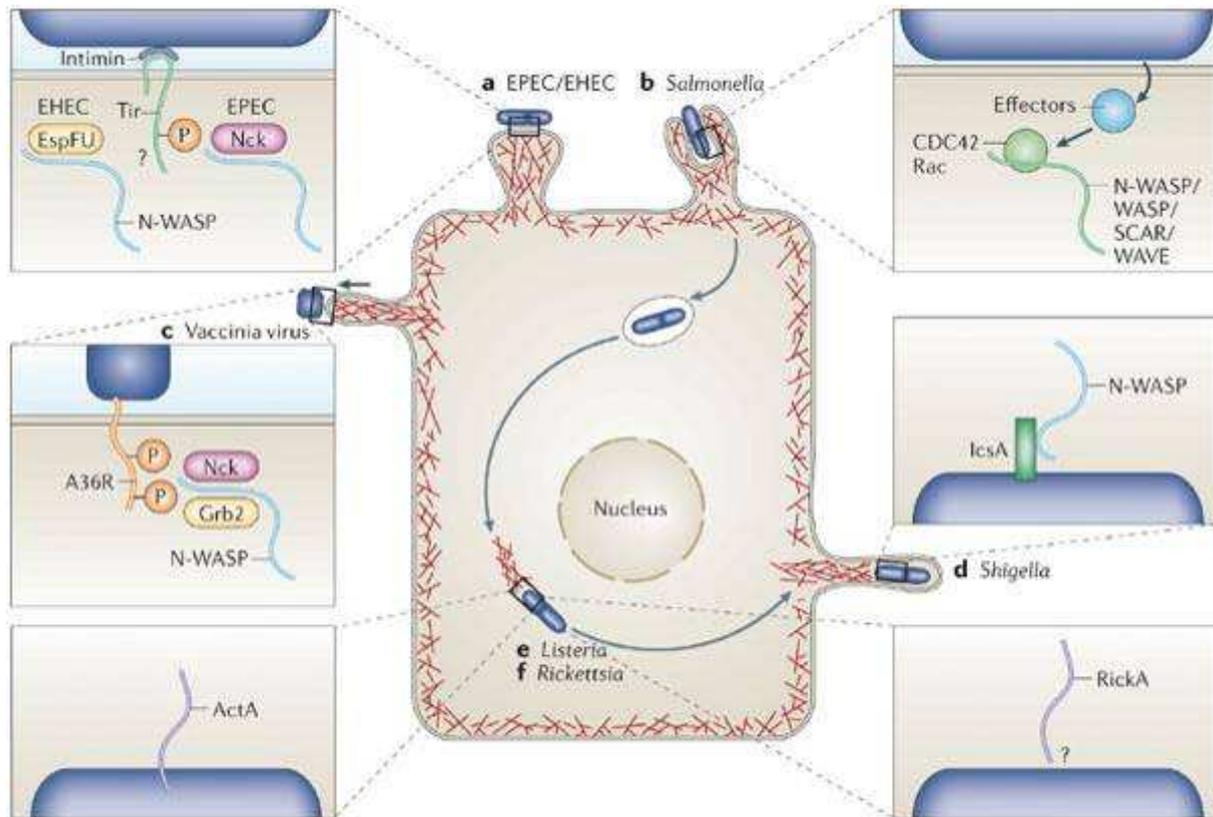
Plusieurs microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* (Tilney and Portnoy 1989), *Listeria Ivanovii* (Mounier et al. 1990), *Shigella Flexneri* (Bernardini et al. 1989), *Rickettsia* (Heinzen et al. 1999), ainsi que le virus de la vaccine (Cudmore et al. 1995) sont capables de provoquer leur internalisation dans des cellules hôtes puis de lyser la vacuole d'endocytose pour se retrouver libres dans le cytoplasme. Tous ces pathogènes se déplacent dans la cellule hôte en utilisant la polymérisation de l'actine comme force de propulsion. Ils induisent d'abord la formation d'un nuage d'actine homogène à leur surface, qui, ensuite, se polarise et s'ouvre pour aboutir à la formation d'une comète composée d'un réseau réticulé de filaments d'actine (Tilney et al. 1992) qui les propulse comme un fusée, d'où le terme de « *rocketting motility* » (exemple de *Listeria* dans la Figure B1).



**Figure B1: *Listeria* se déplace à l'intérieur des cellules qu'elle infecte en se propulsant avec une comète d'actine. (Theriot et al.)**

*A* : Cellule infectée par *Listeria*. La bactérie est marquée en rouge et l'actine en vert.  
*B* : *Listeria* propulsée dans le cytoplasme par la comète d'actine.

Toutes ces bactéries court-circuitent, à divers niveaux, les voies de signalisation de la cellule pour recruter le complexe Arp2/3 et initier la polymérisation d'actine à leur surface (Figure B2). Les stratégies de *Listeria*, *Shigella* et du virus de la vaccine sont détaillées dans les paragraphes suivants.



**Figure B2: Plusieurs bactéries pathogènes sont capables de détourner le complexe Arp2/3 directement ou par l'intermédiaires d'activateurs présents dans la cellule hôte.**

Certaines d'entre eux activent le complexe Arp2/3 depuis l'extérieur de la cellule pour induire une réorganisation du cytosquelette d'actine conduisant à leur internalisation. Cette restructuration de l'actine sert à faciliter leur attachement à la membrane plasmique (a : EPEC et EHEC, formes enteropathogènes et enterohémorragiques d'*Escherichia coli*), ou encore à promouvoir leur phagocytose (b : *Salmonella*). D'autres pathogènes (d : *Shigella*; e : *Listeria*; f : *Rickettsia*) utilisent la polymérisation de l'actine pour former des comètes qui les propulsent à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte et permet leur dissémination vers les cellules voisines. Pour chacun de ces pathogènes est détaillée la stratégie utilisée pour détourner les voies de signalisation. EPEC/EHEC (a) et le virus de la vaccine (c) injectent des protéines leur permettant de recruter des protéines adaptatrices (Grb2 et Nck) capables de recruter et d'activer N-WASP ; *Salmonella* (b) injecte un effecteur qui active Rac et CDC42 ; la protéine IcsA présente à la surface de *Shigella* (d) recrute N-WASP tandis que *Listeria* (e) et *Rickettsia* (f) disposent de leur propre protéine activatrice du complexe Arp2/3 (ActA et RickA respectivement). D'après (Goley and Welch 2006)

### **a) Listeria monocytogenes**

La motilité de *Listeria*, une bactérie gram-positif, a été décrite pour la première fois en 1989 par Tilney (Tilney and Portnoy 1989). En suivant la dynamique de l'actine-F dans des macrophages infectés par *Listeria*, Theriot et collaborateurs ont montré que la vitesse de propulsion des bactéries était égale à celle de la polymérisation de l'actine dans les comètes (Theriot et al. 1992). La protéine de surface ActA s'est révélée nécessaire et suffisante à la motilité de la bactérie: en effet, une souche de *Listeria* qui n'exprime pas ActA est incapable de stimuler l'assemblage d'actine. Par ailleurs, des bactéries normalement non motiles transformées avec ActA acquièrent la capacité à former des comètes (Kocks et al. 1995). Toutes les autres protéines nécessaires au mouvement telles que l'actine, le complexe Arp2/3, les cross-linkers (type  $\alpha$ -actinine), proviennent du cytoplasme de la cellule infectée. Plusieurs études utilisant des extraits ont permis d'observer la motilité de *Listeria* dans des conditions acellulaires : les bactéries forment des comètes dans les extraits d'œufs de *Xenopus* tout comme dans des cellules infectées (Theriot et al. 1994; Marchand et al. 1995).

### **b) Shigella flexneri**

*Shigella flexneri*, une bactérie gram-négative, utilise un type de motilité très similaire. La motilité intracellulaire de *Shigella* requiert la protéine transmembranaire IcsA (Bernardini et al. 1989), qui est la seule protéine bactérienne requise pour la motilité de *Shigella*. L'expression de IcsA dans la bactérie non motile *Escherichia Coli* est suffisante pour induire son mouvement dans des extraits (Goldberg and Theriot 1995), (Kocks et al. 1995). *Shigella* utilise une stratégie légèrement différente de *Listeria* : tandis qu'ActA recrute le complexe Arp2/3 directement à la membrane chez *Listeria*, IcsA recrute et active N-WASP en mimant l'effet de Cdc42 chez *Shigella* (Suzuki et al. 1998), (Egile et al. 1999) (Figure B2).

### **c) Le virus de la Vaccine**

Le virus de la vaccine est un autre exemple de pathogène qui détourne le complexe Arp2/3. La phosphorylation de la Thyrosine 112 de la protéine virale A36R par les kinases de la famille Src est essentielle à la motilité du virus (Frischknecht et al. 1999). La protéine A36R phosphorylée est capable de recruter la protéine adaptatrice Nck qui recrute à son tour le complexe WIP-N-WASP (Moreau et al. 2000). Le recrutement de N-WASP permet l'activation du complexe Arp2/3 et l'initiation d'une comète d'actine.

## 2°) Les bactéries propulsées par l'actine: un système modèle

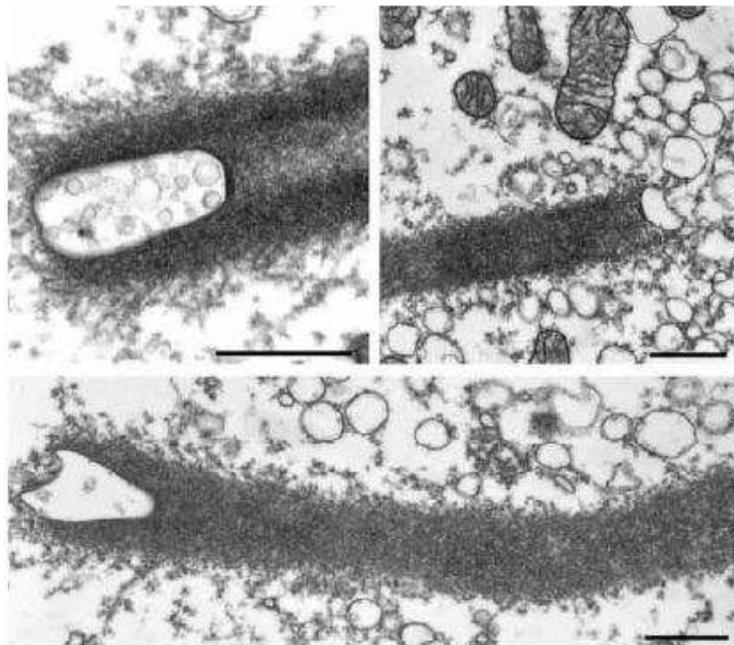
La multiplicité des fonctions de l'actine dans divers processus cellulaires, et la redondance des protéines interagissant avec l'actine ont rendu difficile une approche strictement cellulaire des mécanismes de motilité. La motilité des pathogènes est un système plus simple qui n'utilise que la force de propulsion fournie par la polymérisation d'actine. Ce système permet de s'affranchir de toute la signalisation en amont de la cascade biochimique pour en déterminer les étapes et les acteurs. Contrairement à la cellule, la polymérisation de l'actine s'effectue à l'extérieur du pathogène, ce qui facilite grandement l'expérimentation, par exemple en utilisant des drogues agissant sur la polymérisation de l'actine.

De nombreuses observations ont suggéré que les réactions biochimiques élémentaires qui gouvernent la protrusion du lamellipode d'une cellule eucaryote et la propulsion de la bactérie *Listeria* sont les mêmes. Ainsi, il a été confirmé que la structure dendritique formée au bord avant du lamellipode se retrouve également près de la surface de *Listeria*. De plus, les extrémités barbées des filaments d'actine sont orientées vers la surface de la bactérie (Tilney and Portnoy 1989). Dans le lamellipode, les filaments d'actine pointent également leur extrémité barbée vers la membrane plasmique. Enfin, la dynamique de l'actine à l'arrière de la bactérie *Listeria* est très similaire à celle au niveau du lamellipode. L'incorporation d'actine fluorescente à l'arrière de la bactérie en mouvement a montré que les filaments restaient à une position fixe alors que la bactérie avançait (Theriot et al. 1992). Ceci suggère que des monomères d'actine viennent s'incorporer à l'interface entre la bactérie et la comète. En se servant de la comète anciennement formée comme appui, l'ajout d'un nouveau monomère entre la surface de la bactérie et le gel pousse sur la comète et propulse la bactérie vers l'avant (Theriot et al. 1992). Wang avait obtenu des résultats similaires sur la dynamique de l'actine au bord avant des cellules en mouvement (Wang 1984). Ces bactéries sont donc devenues un système modèle pour étudier les phénomènes de motilité *in vitro*.

Différents travaux *in vitro* ont donc été réalisés avec de telles bactéries pour élucider les facteurs moléculaires qui interviennent dans la cascade des réactions à l'origine de la polymérisation de l'actine. Welch et collaborateurs ont montré que le complexe Arp2/3 purifié à partir de plaquettes sanguines est suffisant pour promouvoir *in vitro* l'assemblage de l'actine à la surface de *Listeria* (Welch et al. 1997).

*In vitro*, le domaine N-terminal de ActA interagit avec Arp2/3 et il suffit à stimuler la formation de filaments d'actine par Arp2/3 (Welch et al. 1998). Ces résultats montrent que la protéine ActA permet à *Listeria* de recruter Arp2/3 présent dans le cytoplasme de la cellule infectée et d'initier une comète d'actine avec laquelle elle se propulse.

Il est à noter que la propulsion de vésicules intracellulaires par des comètes d'actine est un processus physiologique et qu'Arp2/3 est impliqué dans ce mouvement comme dans celui de *Listeria*. Les vésicules endocytaires appelées pinosomes ont un mouvement identique dans des mastocytes en culture (Merrifield et al. 1999). Des endosomes et des lysosomes développent eux aussi des comètes d'actine similaires à celles de *Listeria* dans des œufs de *Xenopus* (Taunton et al. 2000). Taunton et collaborateurs ont montré que N-WASP était présent à la surface des vésicules et activait le complexe Arp2/3 (Taunton 2001) (Figure B3). La formation de telles comètes sur des vésicules est régulée par le PIP2 et elle est stimulable par la surexpression de la phosphatidylinositol-5-kinase de type I et/ou par l'inhibition de tyrosines phosphatases (Benesch et al. 2002), (Rozelle et al. 2000; Southwick et al. 2003). Ces trois études prouvent toutes la présence d'Arp2/3, de WASP ou N-WASP à la surface des vésicules. On peut donc imaginer qu'Arp2/3 activé par N-WASP joue un rôle dans le transport vésiculaire. D'autres études laissent supposer un rôle pour la polymérisation de l'actine accélérée par Arp2/3 dans le bourgeonnement de telles vésicules (Kessels and Qualmann 2002).



**Figure B3 : Coupe en microscopie électronique d'endosomes propulsés par des comètes d'actine. Echelle = 500 nm (Taunton et al 2000)**

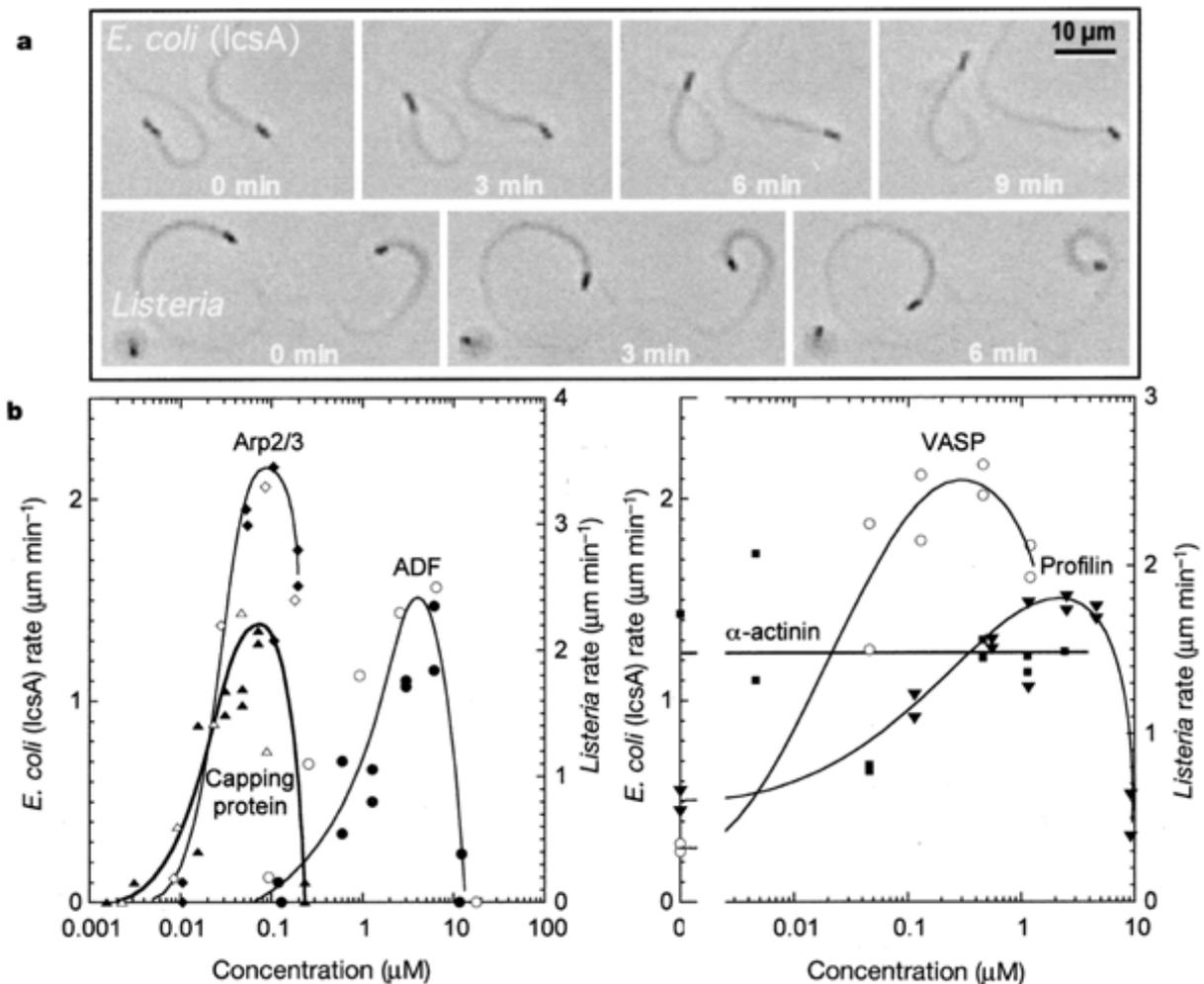
### **3°) Le milieu de motilité reconstitué.**

Les approches de génétique, de biochimie, de biologie cellulaire, ainsi que les pathogènes *Listeria* et *Shigella* ont permis d'identifier le complexe Arp2/3 comme un facteur clé de la motilité cellulaire basée sur l'actine en aval de nombreuses voies de signalisation. Il restait à élucider le mécanisme et caractériser les facteurs cellulaires qui engendrent la croissance soutenue d'un réseau d'actine en treadmilling rapide.

Le concept de treadmilling régulé a été validé en 1999 par Loisel et collaborateurs, qui ont reconstitué la motilité de *Listeria* à partir d'un ensemble minimal de protéines purifiées nécessaires et suffisantes pour soutenir la motilité basée sur l'actine (Loisel et al. 1999; Pantaloni et al. 2000) (Figure B4). Ces auteurs ont montré que le mouvement résultait d'un équilibre entre la création spatialement restreinte de nouveaux filaments et l'arrêt de la croissance de ces filaments par coiffage.

En analysant la dépendance entre la concentration des composants du milieu et la vitesse de propulsion, ces auteurs ont montré que l'accélération du treadmilling des filaments par l'action synergique des protéines du milieu (ADF, profiline et capping proteins) est effectivement à l'origine de la vitesse de propulsion. Dans ce milieu qui ne contient donc que des protéines purifiées, la bactérie se déplace à environ 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$ , ce qui est bien inférieur aux vitesses observées *in vivo*. Aussi, l'addition d' $\alpha$ -actinine, de profiline et de VASP (uniquement dans le cas de *Listeria*) augmente la vitesse de la bactérie, qui atteint des valeurs plus proches de celles observées dans des extraits cellulaires ( $\approx 3 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

Les protéines du milieu de motilité permettent de tamponner la concentration d'actine-G-ATP à l'état stationnaire à environ 2  $\mu\text{M}$  et, de ce fait, d'assurer la croissance rapide des extrémités barbées jusqu'à des valeurs proches des vitesses de propulsion observées avec des bactéries en extraits cellulaires. Il a en effet été démontré que la profiline et l'ADF peuvent agir de manière synergique pour accélérer le treadmilling de l'actine pure d'un facteur 100 (Didry et al. 1999) et que l'ADF peut accélérer le treadmilling de l'actine en présence de gelsoline et d'Arp2/3 (Ressad et al. 1999).



**Figure B4 : Le milieu de motilité reconstitué (Loisel et al. 1999)**

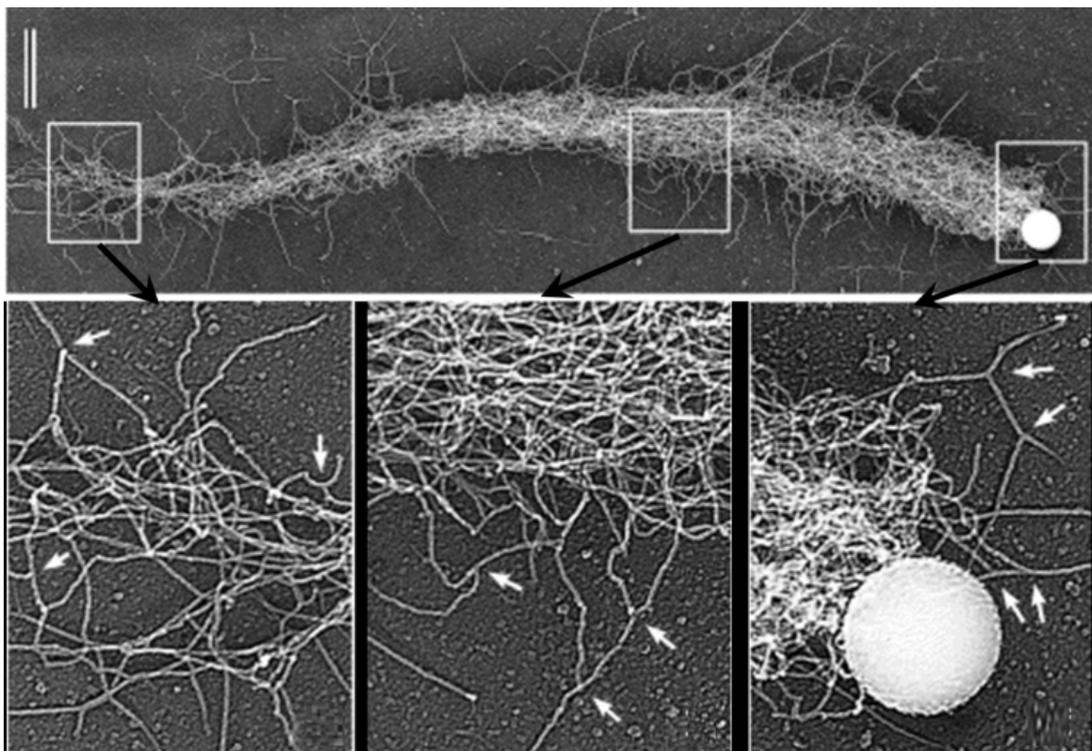
*a. E. Coli exprimant IscA et Listeria dans le milieu de motilité*

*b. Vitesses de propulsion pour E Coli (points noirs) et Listeria (points blancs) en fonction des concentrations des protéines essentielles (à gauche) et non essentielles (à droite)*

Ces résultats constituent une avancée majeure des techniques visant à comprendre la biochimie du mouvement. La composition chimique du milieu de motilité reconstitué est parfaitement contrôlée, ce qui présente un gros avantage par rapport aux extraits cellulaires de composition variable. Ceci permet une approche quantitative du rôle des réactions moléculaires dans le comportement motile à l'échelle mésoscopique (Bernheim-Groswasser et al. 2002), (Wiesner et al. 2003). On notera cependant qu'on observe des différences notables de comportement en utilisant des protéines issues de purifications faites à différentes dates, mais les différences observées sont bien moindres que lorsqu'on travaille avec des extraits cellulaires.

## II Biomimétisme de la motilité : propulsion d'objets artificiels.

Après la découverte que la protéine ActA était suffisante pour engendrer la propulsion par polymérisation d'actine (Kocks et al. 1995), plusieurs équipes ont tenté de mettre au point des systèmes biomimétiques encore plus épurés en fonctionnalisant des objets artificiels (tels que des microsphères de polystyrène) par des activateurs de la polymérisation de l'actine. Les premiers essais biomimétiques ont été effectués avec des billes de polystyrène recouvertes d'ActA (Cameron et al. 1999); (van Oudenaarden and Theriot 1999), (Noireaux et al. 2000). Lorsque ces billes sont plongées dans des extraits cellulaires (de Xénope ou de cellules Hela) ou dans le milieu de motilité minimum, elles développent un gel d'actine initialement symétrique puis initient un mouvement unidirectionnel semblable à celui de *Listeria* (Figure B5).



**Figure B5 : Micrographie d'un réseau branché d'actine généré par une microbille de 0,5 µm recouverte à 37,5% d'ActA dans des extraits d'oeufs de Xénope dilués à 40%. Les flèches indiquent les points de branchement réalisés par Arp2/3 (Cameron et al. 2001)**

De tels systèmes reconstitués possèdent de nombreux avantages et augmentent considérablement le spectre des études que l'on peut mener. En effet, ils permettent de contrôler non seulement les paramètres physiques du support (géométrie, taille, rigidité...) mais aussi les paramètres biochimiques (nature et densité surfacique de la protéine de fonctionnalisation du support, composition du milieu...). Ils permettent d'étudier les mécanismes de génération de force par polymérisation dirigée de l'actine dans un environnement contrôlé. Ces approches ont pour vocation de développer des modèles pouvant ensuite être transposés au mouvement du lamellipode. Différents objets ont pu être fonctionnalisés avec des activateurs de la polymérisation d'actine : après des premières études sur des objets rigides, divers groupes se sont tournés récemment vers la propulsion d'objets déformables.

### **1°) Objets artificiels rigides**

Différents objets ont pu être fonctionnalisés avec des activateurs de la polymérisation d'actine, parmi lesquels on peut citer des billes de polystyrène, de latex ou de verre, voire même des fibres de verre. Tout comme les bactéries pathogènes décrites précédemment, ces objets génèrent d'abord un nuage d'actine homogène à leur surface. La brisure de symétrie du nuage d'actine aboutit à la formation d'une comète d'actine qui va propulser l'objet. L'influence de différents paramètres physico-chimiques sur les caractéristiques du mouvement a été étudiée par différents groupes. Quelques résultats sont décrits ci-dessous.

#### **a) L'étape critique pour initier le mouvement: la brisure de symétrie**

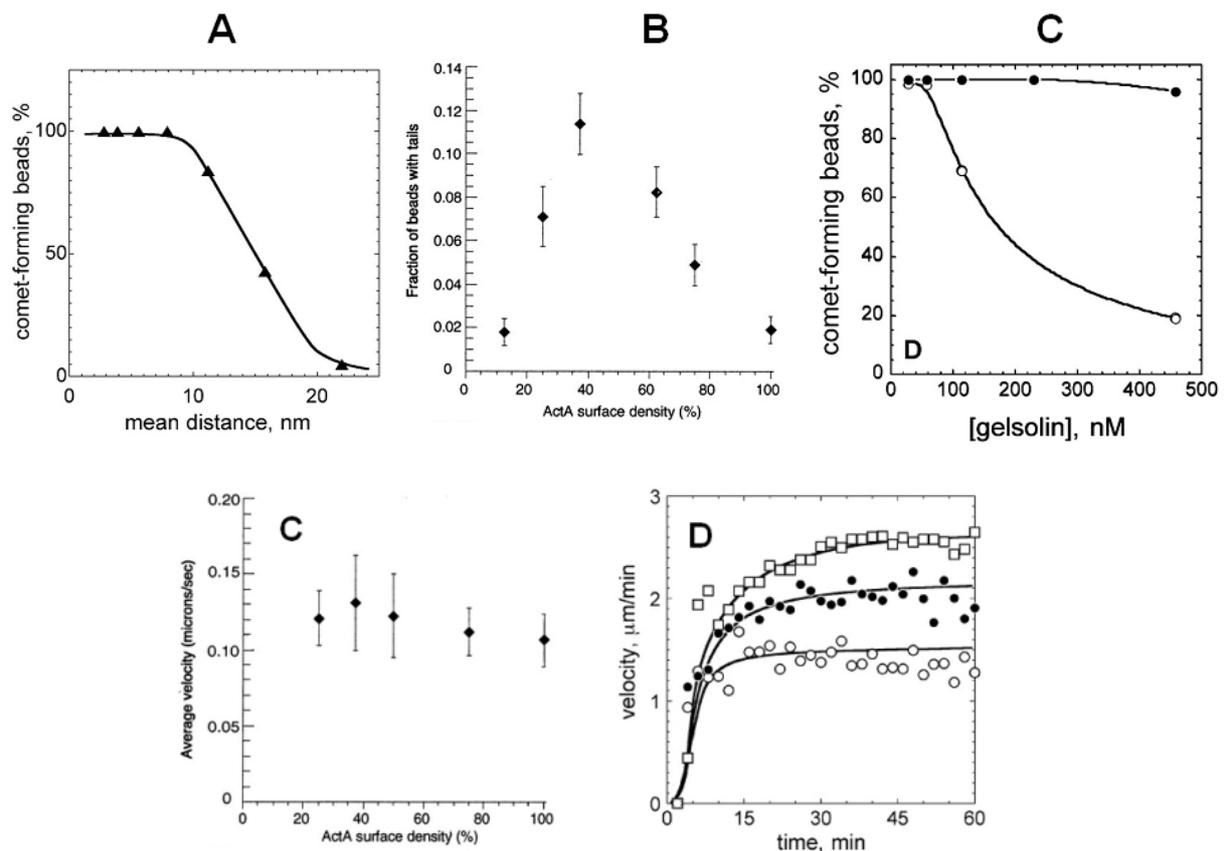
Différentes études ont porté sur la brisure de symétrie, qui est à l'origine de la directionalité du mouvement. Elle peut être caractérisée par la mesure du temps entre le moment où la bille est placée dans les extraits cellulaires et celui où elle se met en mouvement. Ce temps dépend du milieu (extraits cellulaires ou milieu reconstitué) et de la taille des objets. Bernheim-Groswasser et collaborateurs ont ainsi montré que dans le milieu reconstitué, toutes les billes se mettent en mouvement, quelle que soit leur taille, et que le temps de brisure varie linéairement avec la taille des billes (Bernheim-Groswasser et al. 2002). Dans des extraits cellulaires Hela, Cameron et collaborateurs n'ont observé la polarisation du gel d'actine que sur des petites billes (diamètre  $\leq 0.5 \mu\text{m}$ ). Pour observer le mouvement de billes plus grandes, ils ont fonctionnalisé directement la moitié de la surface des billes pour éliminer le problème de la brisure de symétrie (Cameron et al. 1999).

### ***b) Propulsion en régime stationnaire***

Après polarisation du nuage d'actine, les objets se mettent en mouvement pour atteindre un régime stationnaire de propulsion. Là encore l'effet de la taille des billes a été étudié, mais également l'influence de la densité de fonctionnalisation ou du milieu biochimique, et l'effet d'une force externe opposée au mouvement. Il a été montré qu'il existe une densité surfacique d'activateurs optimale pour que les billes forment des comètes (Figure B6 A et B) dans des extraits cellulaires (Cameron et al. 1999) comme dans le milieu de motilité reconstitué (Wiesner et al. 2003). Dans la deuxième étude, l'utilisation de protéines purifiées a aussi permis de constater qu'à densité de surface constante, le nombre de billes formant des comètes dépend du taux de coiffe (Figure B6-C) : pour les billes à basse densité d'activateur, la capacité de former des comètes décroît fortement quand le taux coiffe augmente, tandis que les billes à haute densité d'activateur nucléent presque à 100% quel que soit le taux de coiffe. Ces résultats soulignent l'effet antagoniste des protéines de coiffe sur l'activité de branchement, en accord avec le modèle de branchement bar le bout barbé de Pantaloni et collaborateurs (Pantaloni et al. 2000).

Les deux études ont également montré, par microscopie à épifluorescence et à contraste de phase, que la densité d'actine dans les comètes augmente avec la densité surfacique d'activateurs. Wiesner et collaborateurs ont montré que la concentration d'actine-F dans la comète est de l'ordre du mM, comme dans le lamellipode (Abraham et al. 1999). Par rapport au milieu environnant (3  $\mu$ M), la concentration d'actine-F est donc enrichie d'un facteur 300 dans les comètes.

Les résultats de Cameron indiquent que la vitesse de propulsion ne dépend pas de la densité de surface d'ActA, dans les extraits cellulaires (figure B6-D). Au contraire, Wiesner et collaborateurs ont montré que la vitesse de propulsion dépend de la densité d'activateurs en utilisant une gamme de billes recouvertes d'activateur à activité spécifique connue. La vitesse augmente avec la densité de surface en activateurs puis atteint un plateau lorsque la distance moyenne entre deux activateurs est de 2.8-5.6 nm.



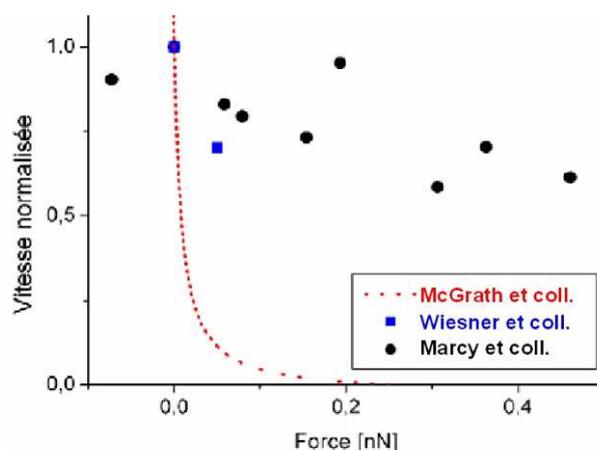
**Figure B6 : Influence de la densité d’activateurs sur la propulsion de billes N-WASP dans le milieu minimum et de billes ActA dans des extraits cellulaires (d’après (Wiesner et al. 2003), (Cameron et al. 1999) respectivement).**

*A, B : Influence de la densité d’activateurs sur la proportion de billes formant des comètes. C : Influence de la concentration de gelsoline sur la proportion de billes N-WASP qui forment des comètes pour une densité d’activateurs élevée (points noirs) et pour une densité faible (points blancs).*

*D, E : La vitesse stationnaire des billes ne dépend pas de la densité d’ActA dans des extraits cellulaires alors qu’elle augmente avec la densité de N-WASP.*

La nature du milieu dans lequel sont placées les billes affecte également le mouvement : hormis dans les expériences de Cameron et collaborateurs, la vitesse de propulsion mesurée est plus élevée dans les extraits cellulaires (jusqu’à 10  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) que dans le milieu reconstitué (de 0.5 à 5  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) pour des raisons qui ne sont pas encore claires. Un bon candidat est la présence de la protéine VASP dans les extraits. Cette protéine est connue pour augmenter la vitesse des bactéries d’un facteur 10 (Smith et al. 1996). Un travail a montré que l’ajout de cette protéine au milieu reconstitué augmente la vitesse des billes ActA d’un facteur 3 (Samarin et al. 2003).

Au cours de son cycle d'infection, *Listeria* doit traverser les parois cellulaires. Elle rencontre alors des forces qui s'opposent à son mouvement pouvant aller jusqu'à plusieurs nanonewtons. Plusieurs études ont eu pour but d'appliquer une force externe au système et d'établir la relation force-vitesse (McGrath et al. 2003), (Wiesner et al. 2003), (Marcy et al. 2004). Deux équipes ont fait varier la force externe en augmentant de la viscosité du milieu, par addition de méthylcellulose (ce polymère a l'avantage de freiner le mouvement des gros objets sans ralentir la diffusion des monomères d'actine, donc la polymérisation des filaments). McGrath et collaborateurs ont ainsi étudié le mouvement de *Listeria* dans des extraits de cerveau (McGrath et al. 2003), tandis que Wiesner et collaborateurs ont analysé le mouvement de billes fonctionnalisées avec N-WASP dans le milieu reconstitué (Wiesner et al. 2003). Les premiers ont trouvé un comportement biphasique avec une très forte décroissance de la vitesse (d'un facteur 20) pour des forces comprises entre 0 à 50 pN, suivie d'une très faible décroissance jusqu'à 180 pN. Les seconds ont au contraire mesuré une vitesse de propulsion qui n'est que très modérément affectée par une force visqueuse allant jusqu'à 50 pN (diminution de la vitesse de 30%). Plus récemment, un diagramme force-vitesse a été établi par micromanipulation de la comète d'actine avec une micropipette (Marcy et al. 2004). Dans cette dernière étude, la croissance de la comète n'a jamais été stoppée (ralentissement d'environ 90%), même en appliquant une force de 4.3 nN. Les points obtenus par Marcy et collaborateurs sont cohérents avec ceux obtenus par Wiesner et collaborateurs (Figure B7), alors que dans l'étude de Mc Grath et coll, la décroissance de la vitesse est telle que *Listeria* perd presque 90% de sa vitesse dès 50 pN (Figure B7)



**Figure B7 : Relation force-vitesse mesurée par micromanipulation (Marcy et al. 2004) ou en augmentant force visqueuse par ajout de méthylcellulose (Wiesner et al. 2003). La vitesse est normalisée à la vitesse à force nulle (Marcy et al.) et à la vitesse avec mesurée avec un méthylcellulose à chaine courte (Wiesner et al, 2003)**

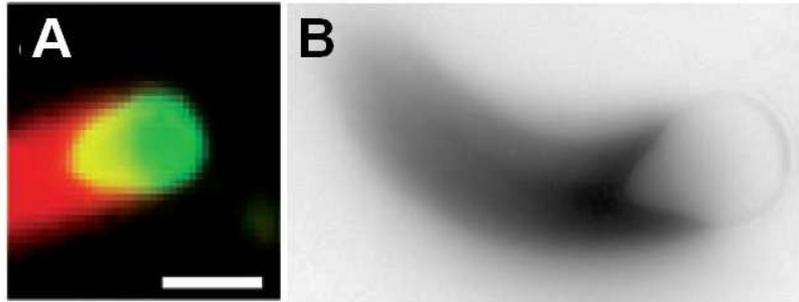
## **2°) Objets artificiels déformables.**

Même si les essais de motilité avec les billes ont permis de faire d'énormes progrès dans la compréhension des mécanismes de génération de force et de mouvement, ils ne peuvent rendre compte totalement des événements se produisant au bord avant d'une cellule en mouvement. En effet, dans la cellule, les activateurs d'Arp2/3 ne sont pas immobilisés comme sur les supports mentionnés ci-dessus : ils sont libres de diffuser à la surface de la membrane plasmique. Pour rendre compte de cette propriété, des billes de verres ont été recouvertes d'une monocouche de lipides capables de recruter les activateurs de la polymérisation d'actine, ce qui leur permet de diffuser à la surface (Giardini et al. 2003), (Co et al. 2007) Ce dernier système est encore perfectible puisque la membrane plasmique des cellules est déformable. Les propriétés élastiques et mécaniques de la membrane sont susceptibles d'influer sur la morphogenèse du réseau d'actine et sur la force générée. Afin de développer un système biomimétique plus proche de la réalité, des systèmes à support flexible ont été développés à partir de vésicules lipidiques (Upadhyaya et al. 2003), (Giardini et al. 2003)) ou d'émulsion d'huile (Boukellal et al. 2004).

### **a) Systèmes propulsés**

Les premiers essais ont été développés à partir de vésicules lipidiques (Upadhyaya et al. 2003), (Giardini et al. 2003) ou de gouttelettes d'huile (Boukellal et al. 2004) plongées dans des extraits cellulaires. Des vésicules portant des lipides-nickel peuvent recruter ActA, qui porte un tag histidine, à leur surface. Les gouttelettes d'huile sont fonctionnalisées avec la partie VCA de WASP, par simple adsorption à l'interface huile-solution aqueuse. Une fois placées dans des extraits, vésicules et gouttelettes développent une comète d'actine qui les déforme et les propulse dans la solution (Figure B8).

Comme la membrane des vésicules et l'interface des gouttelettes sont fluides, ActA comme VCA sont libres de diffuser à leur surface. Au cours de la propulsion, les activateurs viennent s'accumuler à l'arrière de la vésicule ou de la gouttelette (Giardini et al. 2003), (Upadhyaya et al. 2003; Boukellal et al. 2004). Ce phénomène mime la polarisation des activateurs observée chez *Listeria*, qui exprime ActA avec une densité supérieure à son extrémité arrière.



**Figure B8 : Différents objets déformables propulsés par une comète d'actine dans des extraits cellulaires.**

**A** : Vésicule de  $3\mu\text{m}$  (90% EPC – 10% DOGS-NTA-Ni) recouverte d'ActA propulsée par une comète d'actine dans des extraits de cerveau de boeuf supplémentés (entre autres) par de l'Arp2/3, de l'ATP et de l'actine-G. L'actine est marquée à la rhodamine (en rouge) et les vésicules à l'Oregon Green phosphatidylethanolamine (en vert) (Upadhyaya et al. 2003)

**B** : Gouttelette d'huile de  $5\mu\text{m}$  recouverte de VCA propulsée par une comète d'actine dans des extraits de cellules HeLa (Boukellal et al. 2004).

Les molécules d'ActA sont localisées à l'interface entre la vésicule et le gel d'actine, ce qui suggère qu'il existe une interaction entre la membrane et le réseau (Upadhyaya et al. 2003), (Giardini et al. 2003). Il est à noter que la ségrégation des activateurs est un phénomène indépendant de la capacité des vésicules à se déformer. En effet, on observe aussi une ségrégation des activateurs capables de diffuser à la surface de billes rigides recouvertes de lipides (Giardini et al. 2003).

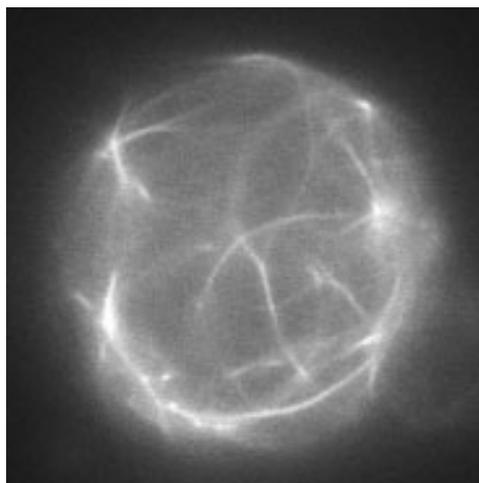
Ces deux systèmes de vésicules ont permis les premiers une estimation des forces locales exercées par le gel sur le support (Upadhyaya et al. 2003), (Giardini et al. 2003). La membrane de la vésicule étant flexible, elle peut se déformer sous l'action de la contrainte exercée par le gel. Il est possible d'estimer la contrainte en mesurant la courbure de la membrane. Les auteurs trouvent que la vésicule subit des forces de compression sur les flancs de la comète, qui participent à la propulsion, et des forces rétractiles à l'arrière, qui s'y opposent, ce qui explique la forme de poire qui caractérise ces vésicules. Giardini et collaborateurs estiment la force exercée pour maintenir cette forme entre 0,4 et 4 nN. Upadhyaya et collaborateurs donnent quant à eux des valeurs maximales de 3-4 nN/ $\mu\text{m}^2$  et 6-8 nN/ $\mu\text{m}^2$  pour les contraintes de compression et de rétraction, respectivement.

### ***b) Systèmes reconstituant la protrusion du lamellipode***

Bien que les molécules mises en jeu soient les mêmes, l'assemblage d'actine qui propulse les bactéries, billes ou vésicules a lieu à l'extérieur de l'objet tandis que, dans les cellules en mouvement, il a lieu à l'intérieur (protrusion de lamellipodes et filopodes). Plusieurs groupes ont déjà encapsulé de l'actine à l'intérieur de liposomes et l'ont fait polymériser en utilisant différentes approches telles que l'électroporation, l'augmentation de la température ou encore l'augmentation de force ionique au moyen d'un ionophore.

La première étude d'encapsulation d'actine à l'intérieur de vésicules été réalisée en 1989 par Cortese et collaborateurs (Cortese et al. 1989). Un mélange de lipides contenant de la valinomycine (un ionophore potassique) en solution dans un mélange éther-eau était injecté dans une solution aqueuse contenant les protéines à encapsuler (actine, gelsoline, filamine). Grâce à la valinomycine dans les membranes, l'addition de potassium à l'extérieur faisait entrer le sel dans les vésicules et induisait la polymérisation de l'actine encapsulée. Les déformations des vésicules, dont l'amplitude dépend de la longueur des filaments, étaient observées par microscopie à contraste de phase.

Dans deux autres études similaires, Limozin et collaborateurs ont utilisé un autre ionophore, l'A23187, pour faire entrer du magnésium et induire la polymérisation d'actine encapsulée dans des vésicules géantes (Limozin et al. 2003), (Limozin and Sackmann 2002). Les auteurs ont observé par épifluorescence la formation d'un cortex d'actine et de faisceaux réticulés par de l' $\alpha$ -actinine ou de la filamine (Figure B9). Il faut noter que dans ces expériences l'actine était marquée à la rhodamine-phalloïdine qui stabilise les filaments.



**Figure B9: Liposome géant encapsulant un réseau d'actine-F**  
(Limozin et al. 2003)

Honda et collaborateurs ont obtenu des liposomes par gonflement spontané à 0°C en présence de 50 ou 100  $\mu\text{M}$  d'actine monomérique (Honda et al. 1999). La polymérisation de l'actine intravésiculaire est facilitée en plaçant ensuite les vésicules à température ambiante. L'actine-F se concentre à la périphérie des liposomes, qui sont déformés. L'amplitude et la morphologie des protrusions sont modulées par l'ajout de protéines réticulant l'actine telles que la fascine, l' $\alpha$ -actine ou la filamine. Dans les études réalisées par Miyata et collaborateurs en 1999 (Miyata et al. 1999), les auteurs synthétisent dans un premier temps des liposomes DMPC:cardiolipine (50:50). Dans un deuxième temps, l'actine encapsulée est polymérisée par électroporation de KCl accompagné d'un indicateur fluorescent (PBFI). La formation rapide de protrusions contenant des surdensités d'actine fluorescente a été observée.

Des expériences semblables ont été réalisées avec de la tubuline encapsulée dans des vésicules. La déformation membranaire générée par les microtubules polymérisant contre les parois a aussi été observée (Houchmandzadeh et al. 1997). Les microtubules sont des polymères beaucoup plus rigides que les filaments d'actine, ce qui facilite la déformation de la membrane.

### **III Modèles biophysiques théoriques.**

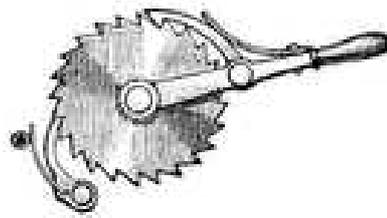
Nous avons vu que la polymérisation d'actine peut exercer un travail mécanique dans divers processus de motilité cellulaire. Comment la force est-elle produite exactement ? La biophysique théorique et expérimentale a apporté des réponses multiples à cette question. On peut distinguer deux types de modèles (qui ne sont pas antagonistes) pour expliquer les mouvements engendrés par polymérisation de l'actine:

- Les modèles mécanistiques dits « microscopiques ». Ces modèles décrivent les propriétés mécaniques d'un filament individuel et les réactions biochimiques mises en jeu lors de sa croissance contre une paroi, puis les extrapolent à un nombre  $n$  de filaments.
- Les modèles élastiques mésoscopiques qui considèrent le réseau d'actine dans sa globalité comme un milieu continu élastique. Ils décrivent les propriétés émergentes de l'ensemble formé par le réseau d'actine. Dans cette description, ce sont les propriétés mécaniques (élastiques) du gel d'actine qui sont à l'origine des forces de propulsion.

## 1°) Modèles mécanistiques microscopiques.

### a) Modèles de Brownian ratchet.

Ces modèles ont été proposés successivement depuis le modèle initial de Hill et Kirshner en 1981 : ils consistent à utiliser l'énergie du mouvement brownien pour générer un mouvement dirigé. Pour comprendre ce mécanisme, imaginons une roue à cliquet (crécelle), libre de tourner aléatoirement dans les deux directions mais solidaire d'une poignée (Figure B10). Une fois que la roue aura passé un cran, il ne peut pas y avoir de retour en arrière et il en résulte donc un mouvement dirigé. Ce dispositif pourrait par exemple faire remonter un petit poids attaché à la poignée, créant ainsi une machine générant du travail. Sans apport d'énergie, ce résultat violerait la loi de Carnot, c'est pourquoi ce système ne peut fonctionner qu'en présence d'une source d'énergie extérieure : ici l'ATP.

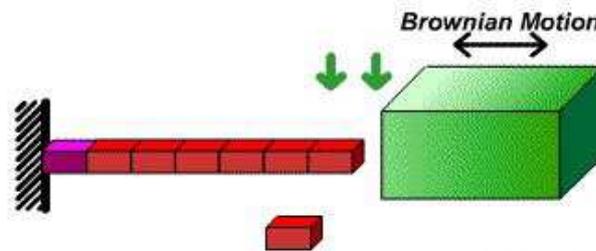


**Figure B10 : Principe du Brownian ratchet illustré par une roue à cliquet**

Dès 1981, Hill et Kirshner ont développé une démonstration basée sur la thermodynamique qui montre que la polymérisation de biopolymères peut exercer un travail mécanique contre une force opposante (Hill 1981). Cette démonstration indique également que l'hydrolyse d'un nucléotide n'est pas une condition nécessaire à la production d'une force mais qu'elle affecte la cinétique du processus et sa directionnalité.

Peskin s'est inspiré de ce concept de « cliquet brownien » pour proposer le modèle du cliquet thermique (*Brownian ratchet*), qui fut le premier modèle proposé pour tenter d'expliquer les mécanismes de génération de force par polymérisation d'actine (Peskin et al. 1993). En 1993, il a considéré que, suite au mouvement brownien de *Listeria*, les monomères d'actine pouvaient s'ajouter dans l'espace libéré entre la comète et la bactérie. Les filaments étant considérés comme des bâtonnets parallèles rigides, la bactérie ne pouvait plus diffuser en arrière après addition des monomères. Par insertion continue de monomères, la bactérie initie donc un mouvement opposé à celui de l'allongement de la comète. Sa vitesse de propulsion est égale à la vitesse de polymérisation des filaments (figure B11).

Diverses études ayant suggéré que le mouvement brownien des bactéries ne peut pas expliquer le mécanisme de la propulsion, Mogilner et Oster ont ensuite proposé le « modèle du cliquet brownien élastique » (*Elastic brownian ratchet*), adapté de celui de Peskin, qui considère cette fois le mouvement brownien des filaments individuels flexibles dans un réseau orthogonal. Ce modèle décrit le filament comme un bâton élastique caractérisé par sa longueur, son angle relatif à la surface de la bactérie et ses vitesses d'élongation et de raccourcissement.



**Figure B11 :** Le filament, en rouge, est constitué de monomères d'actine qui s'assemblent à une extrémité. La position de l'objet, en vert, fluctue, et permet l'insertion de monomères (Kuo and McGrath 2000).

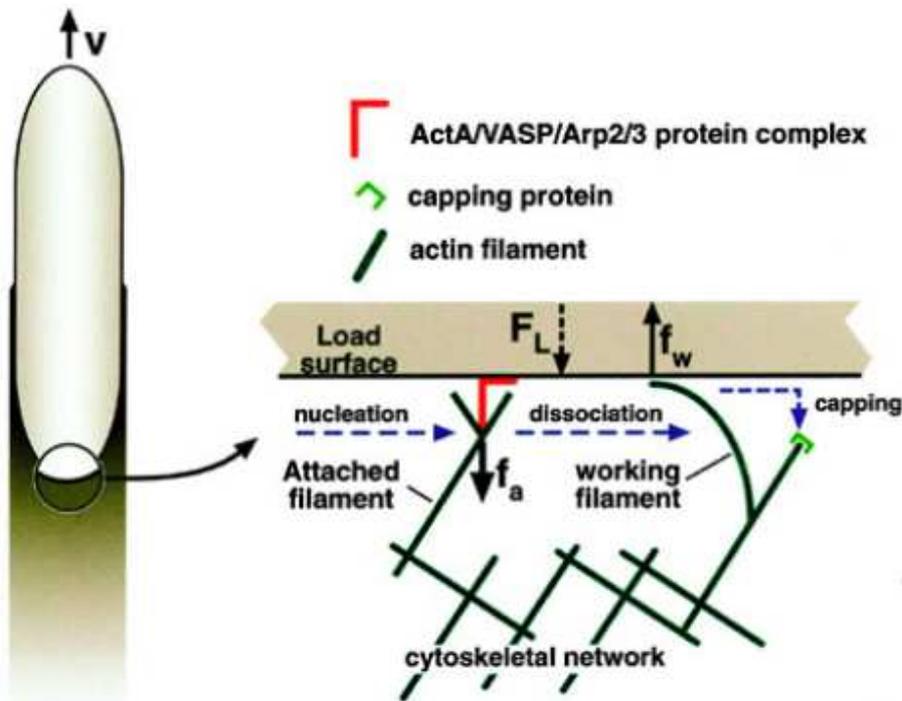
Tout comme le modèle de Peskin, le modèle du cliquet brownien élastique suppose qu'il n'existe pas de lien entre le pathogène (ou l'objet) et sa comète. Or, il existe plusieurs évidences montrant qu'il existe une force liant le gel au support :

- Gerbal et collaborateurs ont montré qu'il n'est pas possible de séparer la bactérie de la comète avec une force de 10 pN appliquée avec des pinces optiques (Gerbal et al. 2000).
- Kuo et collaborateurs ont mesuré le coefficient de diffusion de *Listeria* et montré que les fluctuations thermiques du pathogène sont 20 fois moins élevées que celles d'objets libres de taille similaire dans le même milieu, ce qui indique que la bactérie est attachée à la comète (Kuo and McGrath 2000).
- La forme des vésicules développant une comète permet de déduire l'existence d'une connexion entre l'actine et la surface. En effet, les vésicules s'allongent sous l'effet d'une force rétractile qui ne peut agir que si cette connexion existe, sinon la vésicule relaxerait (Upadhyaya et al. 2003), (Giardini et al. 2003).

Devant ces données expérimentales, Mogilner et Oster ont modifié leur modèle de façon à tenir compte de l'attachement de la surface à la comète d'actine. Cette dernière approche consiste à considérer que les filaments sont attachés de manière transitoire à la surface de la bactérie. Ainsi, le filament naissant serait connecté à la surface par l'intermédiaire des protéines qui activent la polymérisation de l'actine puis il se détache et s'allonge librement jusqu'au moment où il est bloqué par des protéines coiffantes.

Il existe donc deux populations de filaments (Figure B12):

- les filaments attachés à la surface par le complexe protéique ActA/Arp2/3 ou WASP/Arp2/3 qui sont sous tension et s'opposent au mouvement de la bactérie,
- les filaments qui sont libres de polymériser et sont comprimés contre la bactérie, et qui génèrent la force de propulsion en transmettant leur énergie élastique à la bactérie.



**Figure B12 : Le modèle du cliquet élastique attaché (Mogilner and Oster 2003).**

Partant de là, Mogilner et Oster expriment les forces exercées par chaque population de filaments en fonction de la vitesse. Pour une force de rétention extérieure de 0 à 200 pN, le modèle livre une relation force-vitesse bi-phasique avec une décroissance rapide d'un facteur cinq de la vitesse de propulsion dans la gamme 0-20 pN suivie d'une décroissance plus lente. Cette relation décrit très bien la courbe mesurée par McGrath et collaborateurs mais ne parvient pas à expliquer celle observée par Wiesner et collaborateurs. Le modèle prédit également que la relation force-vitesse dépend de la densité de la comète pour des forces de rétention extérieures non nulles mais que la vitesse de propulsion est indépendante de la vitesse de nucléation des filaments. Mogilner et Oster calculent une vitesse théorique de propulsion des billes comparable à celles observées par Cameron et collaborateurs (Cameron et al. 2001). Pour cela, les auteurs doivent estimer en tout 5 paramètres et donner aux 4 autres des valeurs issues de la littérature. Le principal reproche que l'on peut faire à ce modèle est qu'il possède un grand nombre de paramètres ajustables, ce qui le rend difficile à tester expérimentalement.

### **b) Croissance de réseaux branché**

Le seul modèle qui inclut à ce jour un traitement de production de nouveaux filaments à la surface par nucléation ou branchement est celui proposé par Carlsson (Carlsson 2001), (Carlsson 2003)). La simulation tient compte des taux de polymérisation/dépolymérisation, de branchement/débranchement, de coiffe/décoiffe, et de l'orientation des filaments. Ce modèle s'intéresse à la structure de la comète d'actine en fonction des paramètres cinétiques de l'assemblage de l'actine. La probabilité d'ajouter un monomère dépend de la distance entre le filament et l'obstacle. Le coefficient de diffusion de l'obstacle est choisi plus faible que celui des objets libres utilisés pour rendre compte de l'attachement du réseau à l'obstacle. Le modèle ne tient compte ni de l'attachement des filaments à la surface ni de l'élasticité des filaments ou du gel. Le modèle permet d'estimer la vitesse de propulsion, la densité de la comète et l'espacement entre les branches. Ainsi, il prévoit que la densité de la comète augmente avec la force alors que la vitesse ne varie pas. Les travaux de Wiesner et collaborateurs sont en accord avec le modèle de Carlson. En particulier, la vitesse et la densité de branchement diminuent avec le taux de coiffe. Il met également en évidence la pertinence du rapport entre le taux de branchement et le taux de coiffe plutôt que de les considérer isolément.

### **c) Actoclampin'**

Dickinson et Purich ont proposé un modèle qui tente de donner une explication mécanistique de la propulsion en termes de changements conformationnels cycliques liés à l'hydrolyse de l'ATP (Dickinson and Purich 2002). Ce modèle, appelé « clamped-filament elongation model » (modèle d'élongation du filament cramponné) s'inspire du mécanisme d'interaction actine/myosine. Il repose sur un changement d'affinité d'un crampon moléculaire pontant l'extrémité barbée du filament et la surface, qui aurait une affinité plus forte pour l'actine-ATP que pour l'actine-ADP. Suite à l'hydrolyse de l'ATP sur la sous-unité terminale du filament, le crampon avancerait d'une sous-unité sur le filament pour se lier à la dernière sous-unité ATP incorporée. A la différence des modèles microscopiques proposés par Mogilner et Oster, le modèle du filament cramponné prédit que la vitesse de propulsion est limitée uniquement par la concentration d'actine monomérique jusqu'à des forces de rétention extérieures de l'ordre de 6-10 pN par filament, et ne dépend pas du nombre de filaments impliqués dans la propulsion. Les auteurs émettent l'hypothèse que N-WASP pourrait faire partie du crampon.

## 2°) Modèle mésoscopique élastique

Le modèle élastique présente une vision mésoscopique du système dans lequel le mouvement est la conséquence d'une action coopérative des filaments. Ce modèle considère le réseau d'actine comme un gel élastique (Gerbal et al. 2000). L'ajout de monomères à l'interface entre la bactérie et le gel génère une couche d'actine qui déforme et comprime le gel préexistant (Figure B13). Les contraintes mécaniques sont maximales au niveau de la partie extérieure du gel et nulles à la surface de la bille.

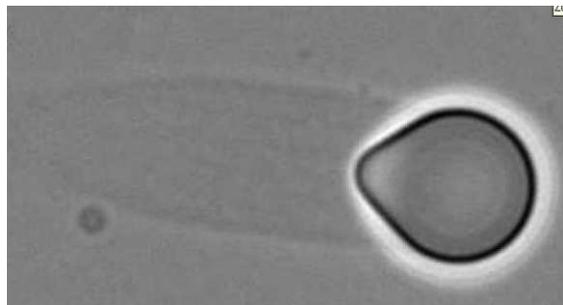


**Figure B13 : Schéma illustrant la mise sous tension du gel des anciennes couches (représentés par des élastiques) par insertion de monomères à l'interface gel d'actine-surface qui forment une nouvelle couche.**

La couche externe est sous contrainte, mais peut aussi présenter des défauts dans l'organisation du gel. En effet certains liens peuvent être plus ou moins éloignés les uns des autres sur toute la surface du gel. Ces imperfections vont provoquer à terme une cassure de la partie externe du gel suivie de l'ouverture du réseau d'actine. La relaxation de la couche interne conduit alors à la formation d'une comète. La bille adopte alors un mouvement de propulsion directionnel. Le gain d'énergie libre produit lors de la polymérisation de l'actine n'est donc pas directement utilisé pour la propulsion : le gel emmagasine d'abord une énergie élastique qu'il relâche par un glissement créant la force propulsive à l'origine du mouvement. Ce glissement génère une force de friction entre le gel et la bactérie qui s'oppose au mouvement : la vitesse dépend donc de l'équilibre entre la force élastique, la force de friction et la force externe appliquée à la bactérie. L'interaction entre le gel et la surface de la bille est décrite par la dynamique d'interaction des filaments avec le complexe activateur-nucléateur (WASP-Arp2/3 ou ActA-Arp2/3). Comme l'ont suggéré Gerbal et collaborateur dès 1999, ce mécanisme de friction est basé sur l'attachement-détachement des filaments d'actine avec l'activateur. Lorsqu'ils interagissent, le glissement du gel entraîne la déflexion des filaments, ce qui crée une force par filament. La force résultante est le produit de cette force locale par le nombre moyen de filaments attachés.

Les forces générées par le gel (de l'ordre du nN), permettent à la bactérie de se déplacer à travers une cellule sans être gênée par d'éventuels obstacles : le modèle prédit une vitesse de propulsion indépendante de la force de rétention extérieure en dessous d'environ 1 nN. Cela est en accord avec les observations qui montrent que *Listeria* a une vitesse constante lors de son déplacement même lorsqu'elle rencontre des membranes. Cela explique également pourquoi les forces appliquées par des pinces optiques ou un champ électrique (maximum 200 pN) ne réussissent pas à ralentir le pathogène. La brisure de symétrie est facilitée avec des petites billes car les contraintes exercées par le gel deviennent importantes plus rapidement qu'avec des billes de grande taille. D'autre part la surface des petites billes étant plus faible, le nombre de filaments d'actine qui constituent le gel est moins important.

Le rôle de l'élasticité du gel d'actine dans la brisure de symétrie et le mouvement est confirmé par l'utilisation d'un matériau déformable comme support. Une goutte d'huile fonctionnalisée (figure B14) montre un petit pincement à l'arrière de la gouttelette. Les filaments d'actine, en s'assemblant à l'arrière, exercent une contrainte sur un objet qui veut constamment s'échapper à cette contrainte. L'analyse de la forme de l'objet permet de déterminer les forces mises en jeu : les forces de poussée se développent sur le bord, les forces de traction s'exercent à l'arrière. Cette traction est capable d'arracher le gel à l'arrière de cet objet, ce qui a pu être démontré expérimentalement.



**Figure B14 : Gouttelette d'huile de 5 $\mu$ m recouverte de VCA propulsée par une comète d'actine dans des extraits cellulaires d'HeLa. (Boukellal et al. 2004)**

Même si l'analyse élastique permet d'expliquer efficacement le mouvement de propulsion, il n'est pas transposable au cas du lamellipode : la topologie étant inversée, la composante majeure du mouvement par propulsion, la force élastique, n'est pas présente. En revanche, il permet d'expliquer un type de propulsion très particulier par sauts successifs observé chez un mutant de *Listeria* et pour des billes dans un essai de reconstitution.

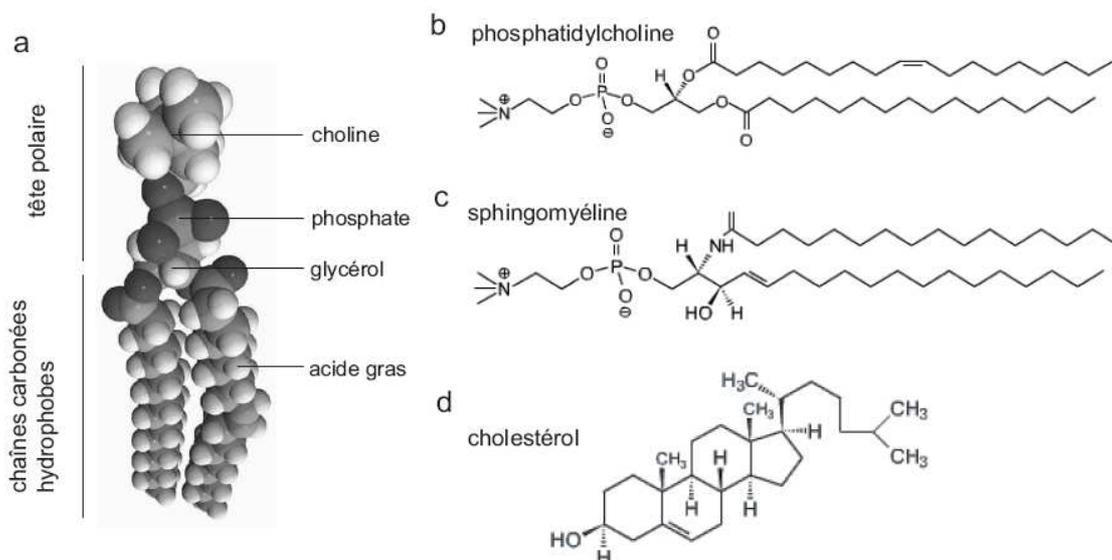
# Partie C : Membranes biologiques et membranes reconstituées.

## I Membranes biologiques

### 1\*) Rôle et composition des membranes biologiques.

Les membranes cellulaires interviennent dans de nombreux processus cellulaires comme le transport intracellulaire, la reconnaissance cellulaire, les phénomènes de conversion d'énergie, etc... Elles sont constituées principalement d'une bicouche lipidique (4-5 nm d'épaisseur) dans laquelle sont insérées des protéines.

Les lipides membranaires constituent de 30 à 50 % de la masse de la membrane. Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire hydrophile et d'une ou deux queues hydrophobes formées de longs résidus d'acides gras ou de groupements aromatiques (Figure C1-A). Les lipides sont classés en plusieurs familles en fonction du groupement de liaison de leur tête polaire et de leurs chaînes carbonées : les glycérolipides, les sphingolipides, les stérols (Figure C1-B & D). D'une cellule à une autre, on observe de fortes variations de composition lipidique, et également entre les deux feuilletts qui constituent la bicouche. Cependant, les glycérolipides restent le composant majoritaire des membranes (des cellules et des organelles).

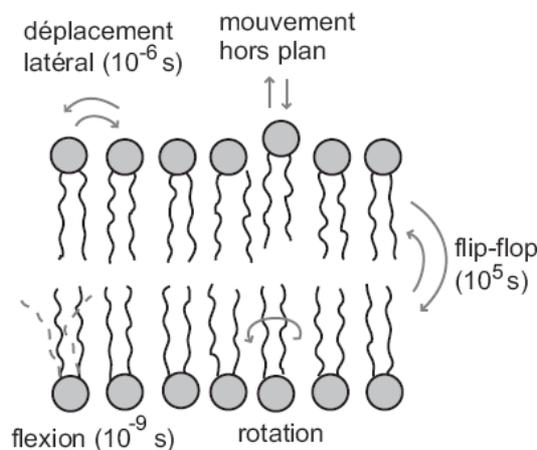


**Figure C1 a) Structure amphiphile des phospholipides. b), c), d) Trois exemples de chaque famille de lipides : la phosphocholine (glycérolipide), la sphingomyéline (sphingolipide) et le cholestérol (stérol).**

## 2°) Une propriété importante des membranes : leur 'fluidité'

Les membranes présentent différentes phases suivant la température du milieu dans lequel elles sont placées. A basse température, les lipides hydratés forment des structures ordonnées denses (phase cristalline). Lorsque la température augmente, cet état devient instable. A la température de sous-transition  $T_s$ , il y a transition vers une phase gel moins compacte, toujours ordonnée, dans laquelle les chaînes aliphatiques sont encore rigides. Au-dessus de la température dite de fusion des lipides ( $T_m$ ), les chaînes deviennent souples et on parle de phase fluide (ou liquide cristalline). Le  $T_m$  augmente avec la longueur de la chaîne aliphatique et diminue avec son degré d'insaturation (nombre de double ou triple liaisons C-C dans la chaîne). Il est à noter que les membranes biologiques contenant beaucoup de phospholipides insaturés, elles sont dans un état fluide à des températures physiologiques.

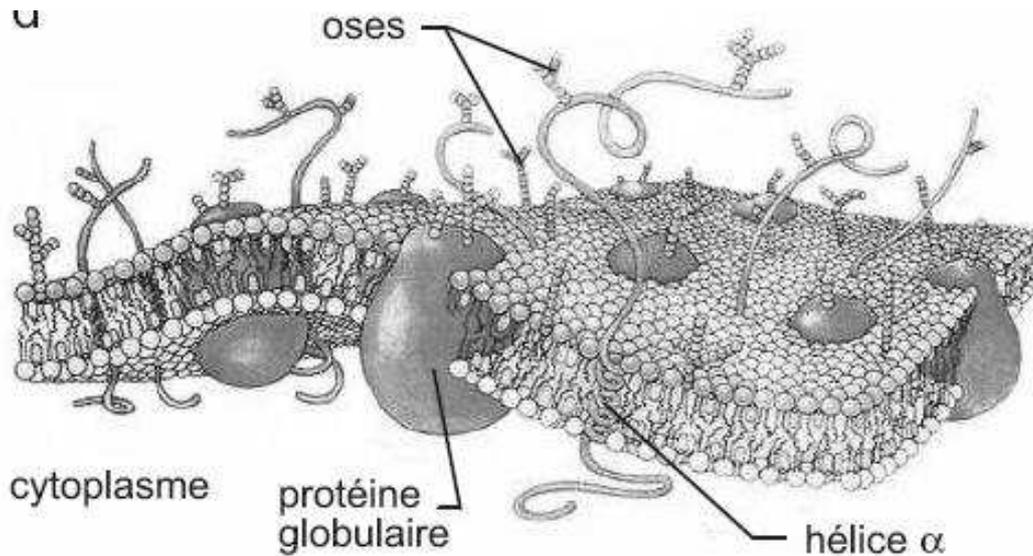
La membrane fluide se caractérise principalement par une grande mobilité des molécules dans la couche lipidique. Il existe différents types de mouvement dans la bicouche (figure C2). Le plus important est la diffusion latérale : les lipides peuvent diffuser librement dans leur monocouche, avec un coefficient de diffusion latérale de l'ordre du  $\mu\text{m}^2/\text{sec}$  (notons que celui des protéines membranaires insérées dans une membrane peut être d'un ou deux ordres de grandeur plus élevé). En plus de la diffusion latérale, on distingue particulièrement les phénomènes de diffusion rotationnelle autour de l'axe du lipide (très rapide) et de passage d'une monocouche à l'autre, ou *flip-flop* (beaucoup plus lent). Différentes techniques telle que le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), résonance magnétique nucléaire et la résonance paramagnétique électronique ont permis de mesurer de manière quantitative ces différents degrés de liberté des lipides.



**Figure C2 : Mouvements des lipides au sein d'une bicouche et leurs temps caractéristiques.**

### 3°) Le modèle de la membrane cellulaire.

Depuis le modèle d'une simple bicouche lipidique en 1925 par Gorter et Grendel, plusieurs évolutions successives ont abouti au modèle moléculaire de 'mosaïque fluide' par Singer et Nicolson en 1972 : lipides et protéines migrent latéralement et aléatoirement par mouvement Brownien dans un fluide bidimensionnel isotrope (figure C3). Cependant, dès 1974, la diffusion aléatoire des composants est remise en question et il est envisagé qu'il existe des microdomaines distincts dans la membrane, appelés radeaux lipidiques (*lipid rafts*).



**Figure C3 : Modèle de Singer et Nicolson, 1972.**

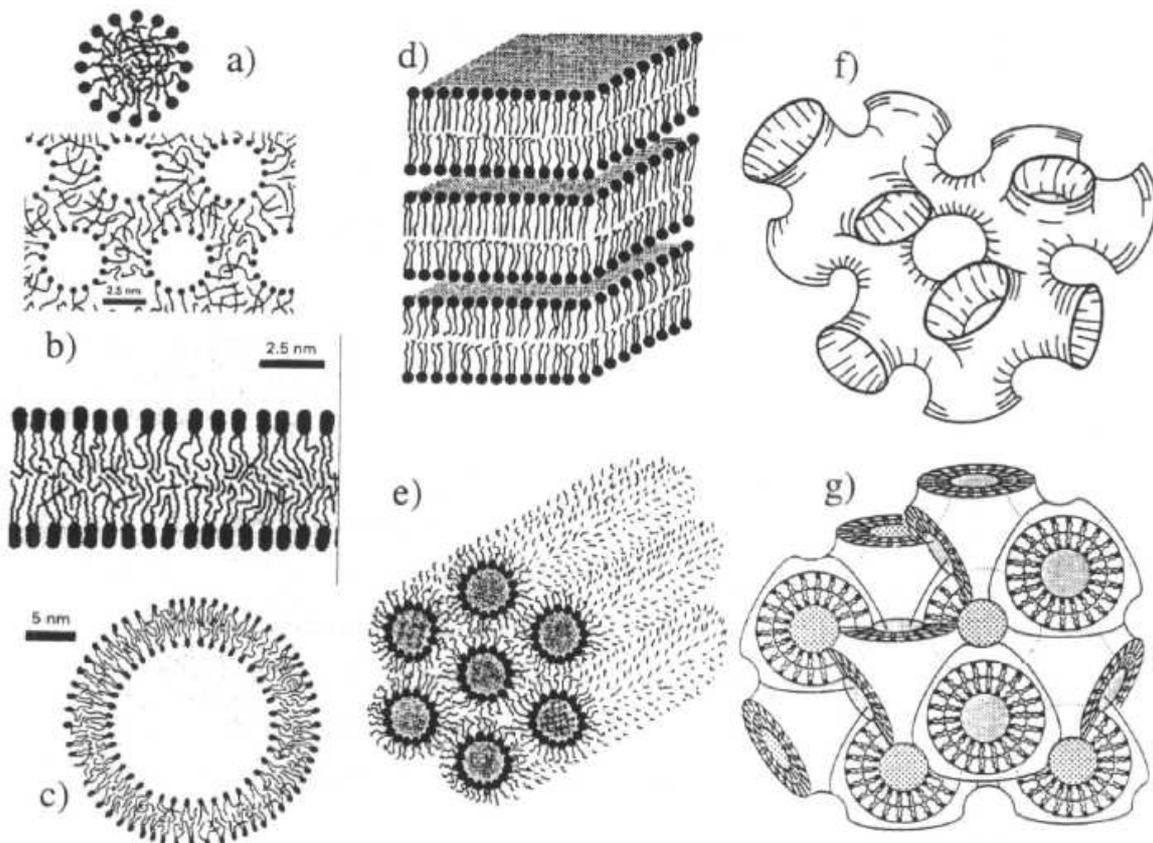
De nombreuses données obtenues avec des techniques de plus en plus sophistiquées telles que les pièges optiques, le suivi de particule unique (Simple Particle Tracking, SPT), ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), confirment aujourd'hui qu'il existe une forte hétérogénéité latérale membranaire, cohérente avec l'existence de micro-domaines dans des phases différentes ("rafts" de lipides et "clusters" de protéines). (Simson et al. 1995), (Sheets et al. 1997), (Dietrich et al. 2002), (Vereb et al. 2003), (Subczynski et al. 2007)

Différentes études suggèrent également que les microdomaines lipidiques ainsi que le cytosquelette d'actine entravent la libre diffusion des molécules membranaires et jouent un rôle important dans le confinement des protéines. (Sheetz et al. 1989), (Jacobson et al. 1995), (Lenne et al. 2006), (Wenger et al. 2007), (Marguet et al. 2006), (Morone et al. 2006)

## II Membranes artificielles.

### 1°) Les liposomes

Les amphiphiles, de par leur caractère bivalent (tête hydrophile et queue hydrophobe) présentent un caractère auto-associatif. En milieu aqueux, pour résoudre la frustration des deux parties au comportement antagoniste, ces molécules, dans un premier temps, s'adsorbent aux interfaces (eau-air ou eau-huile) et les stabilisent, avec la partie hydrophile du côté de l'eau et la partie hydrophobe du côté de l'air ou du milieu non aqueux. Si on augmente la concentration jusqu'à avoir un excès de molécules qui reste en solution, elles vont s'auto-organiser et former des assemblages pour protéger leurs parties hydrophobes de l'eau. Les molécules amphiphiles peuvent donner naissance à des structures de morphologie et de complexité variées, en fonction de leur nature et des conditions physico-chimiques (Figure C4) (Lipowsky 1995).



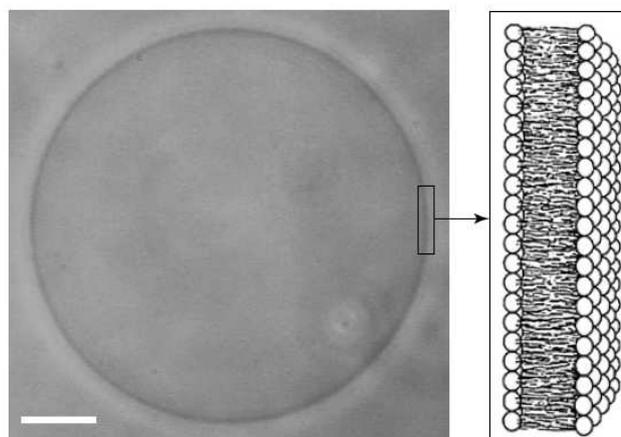
**Figure C4 : Quelques exemples de phases possibles pour des amphiphiles dans l'eau**

(a) Micelle et micelle inverse, (b) bicouche, (c) Vésicule, (d) Phase lamellaire (empilement de bicouches), (e) Phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), (f) phase éponge, (g) phase cubique inverse bicontinue. D'après (Israelachvili 1992) (Lipowsky 1995).

Les liposomes (ou vésicules) artificiels sont des membranes lipidiques fermées qui se sont imposées comme un modèle extrêmement simple de membranes biologiques. Ils ont également trouvé de nombreuses applications en cosmétologie (crèmes hydratantes, antioxydants ...) et en pharmacologie (vecteurs de principes actifs...) (Lasic and Papahadjopoulos 1995). Les liposomes sont souvent classés par leur taille et par la complexité de leur membrane.

On distingue les vésicules unilamellaires constituées d'une seule bicouche et les vésicules multilamellaires qui peuvent comporter plusieurs bicouches. Les vésicules unilamellaires sont classées en trois domaines de taille : les *Small Unilamellar Vesicles* ou SUVs (40 à 100 nm de diamètre), les *Large Unilamellar Vesicle* ou LUVs (100 à 500 nm de diamètre) et enfin les *Giant Unilamellar Vesicles* ou GUVs (1 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre). Leur classification en taille est d'ailleurs liée à leur méthode de fabrication. Dans tous les cas, la préparation des liposomes consiste à mettre des lipides dans un milieu aqueux pour qu'ils s'auto-associent en bicouche. La nature des lipides et les conditions physicochimiques vont déterminer le nombre de bicouches dans la membrane et la taille des objets.

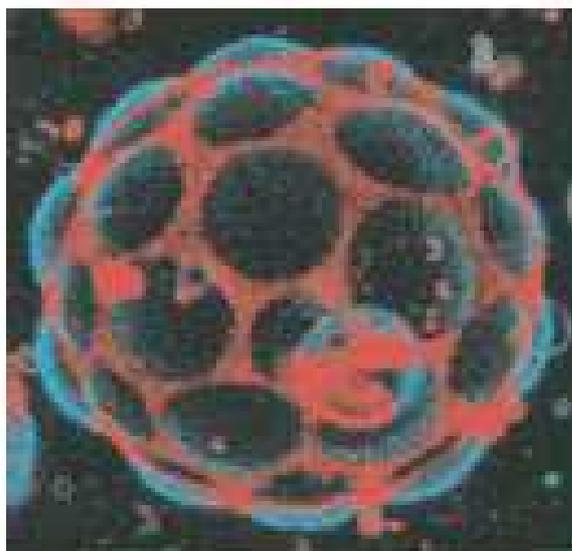
Les liposomes submicroniques (SUV et LUV) ont été intensivement et minutieusement étudiés. De par leur dimension, ils s'apparentent d'avantage à certains organites comme les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou les endosomes. Les vésicules unilamellaires géantes ou GUVs (Figure C5) constituent un système idéal pour l'observation directe par les techniques de microscopie optique (contraste de phase, fluorescence, RICM) des propriétés physiques des membranes. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des formes d'équilibre et des propriétés mécaniques des GUVs (Lipowsky 1995).



**Figure C5: Image d'une vésicule géante observée en microscopie à contraste de phase**  
*Echelle = 10  $\mu\text{m}$ . Le schéma de droite représente le double feuillet de lipides(4-5 nm d'épaisseur).*

## 2°) Mélanges de lipides

Tous les lipides ne sont pas miscibles et on peut observer des séparations de phase dans les mélanges de lipides. La plupart des interactions entre deux lipides différents sont répulsives, les lipides de même nature tendent donc à se rassembler et à former des domaines (Almeida et al. 2005). Les membranes composées de deux types de phospholipides peuvent présenter une séparation de phase à des températures comprises entre les températures de fusion des deux types de lipides. C'est le cas pour des lipides PC ayant des longueurs de chaînes différentes, mais aussi pour des mélanges de lipides ayant des têtes polaires différentes (Shimshick et al. 1973) ou des mélanges de lipides saturés et insaturés. Il existe aussi un couplage entre la courbure de la membrane et la répartition des lipides à la surface : certaines zones courbées vont mieux convenir à certains lipides et d'autres à des lipides de forme différente. La séparation de phase peut donc induire la formation de domaines très courbés (Julicher and Lipowsky 1993); (Julicher and Lipowsky 1996). Seifert a inversement proposé que la courbure de la membrane pouvait induire la séparation de phase (Seifert et al. 1993), ce qui a été montré expérimentalement (Roux et al. 2005). La microscopie à deux photons a rendu possible l'observation des domaines lors de la séparation de phase (Bagatolli and Gratton 2000) (Figure C6), grâce à certains lipides fluorescents (tels que le Laurdan) dont les caractéristiques spectrales diffèrent selon la rigidité de leur chaîne carbonée. De telles sondes permettent de mesurer à la fois l'organisation latérale et le degré d'ordre des chaînes carbonées.



**Figure C6: Séparation de phase observée en microscopie à deux photons sur des GUVs.** Il y a coexistence entre une phase *Lo*, composée de *Sphingomyeline* et de *Cholestérol* (en bleu) et une phase *Ld*, composée de *DOPC* (en rouge) (Baumgart et al. 2003).

Nous avons vu précédemment que des phospholipides sont dans une phase solide au-dessous de la température de fusion  $T_m$  et dans une phase fluide au-dessus de  $T_m$ . L'addition de cholestérol dans une bicouche lipidique peut modifier sa fluidité de deux manières opposées (Yeagle 1985), (Ohvo-Rekila et al. 2002). Lorsque le cholestérol est inséré dans une bicouche en phase fluide, la rigidité de ses quatre cycles carbonés tend à compacter les chaînes des phospholipides et réduire leur mouvement. La bicouche devient moins fluide et moins perméable. Lorsque le cholestérol est inséré dans une bicouche en phase gel, il déstabilise les interactions entre chaînes carbonées et augmente la fluidité de la membrane (Veatch and Keller 2002). Il induit donc un état intermédiaire appelé phase liquide ordonnée, qui correspond à un ordre conformationnel élevé et un ordre translationnel faible. Récemment, de nombreuses équipes ont entrepris de travailler sur des mélanges ternaires constitués de lipides saturés, de lipides insaturés et de cholestérol (Silvius 2003), comme par exemple un mélange DOPC/SM/cholesterol. Ces mélanges ternaires peuvent être considérés comme un système modèle de la membrane cellulaire. En dessous d'une température de miscibilité, on observe une coexistence de deux phases fluides  $L_o$  et  $L_d$  (Dietrich et al. 2001), (Veatch and Keller 2002), dont on peut déterminer la composition : l'une est riche en sphingomyéline et en cholestérol, tandis que l'autre est riche en DOPC (Figure C6).

Les membranes modèles composées de deux à trois espèces lipidiques ne semblent cependant pas suffisantes pour décrire les membranes cellulaires. Certaines équipes incluent donc maintenant des protéines dans une bicouche lipidique (Kahya et al. 2001), (Bacia et al. 2004). D'autres équipes essaient de mimer l'effet du cytosquelette en construisant un réseau d'actine attaché à la surface des liposomes ou dans les liposomes (Helfer et al. 2001), (Limozin et al. 2003). Enfin, les GUVs peuvent aussi être créées directement à partir de membrane cellulaire (Bernardino de la Serna et al. 2004), ce qui permet d'intégrer de nombreux types de protéines et de lipides, en proportions physiologiques.

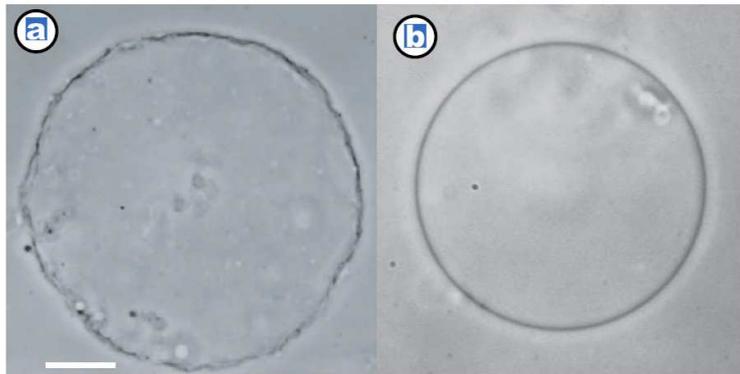
### **III Physique des membranes.**

Depuis les travaux pionniers de Helfrich (Helfrich 1973), Canham (Canham 1970) et Evans (Evans 1973) dans les années 70, les propriétés mécaniques des membranes fluides ont été explorées tant du point de vue théorique que du point de vue expérimental. Les propriétés élastiques des membranes ont permis d'expliquer, au moins en partie, des propriétés des cellules telles que des changements de formes, les processus de fusion et de fission, ou encore certains aspects de la mobilité cellulaire. L'échange de lipides d'une monocouche vers un réservoir extérieur (solution externe ou monocouche associée) est très lent (quelques heures) comparé aux temps caractéristiques de la plupart des expériences. La membrane contient donc un nombre fixé de molécules. On considère qu'une bicouche fermée, non déformée par une force extérieure, est d'aire et de volume constants. La déformation d'une membrane comporte trois composantes : étirement-compression et cisaillement dans le plan de la membrane; courbure dans une direction perpendiculaire au plan de la membrane.

- Dans le cas d'une membrane fluide, les lipides peuvent diffuser librement dans leur monocouche : le module de cisaillement est nul.
- La déformation d'étirement ou de compression correspond à un changement d'aire de la membrane. Un grand module d'étirement-compression ( $\sim 100\text{mN/m}$ ) a été mesuré sur des vésicules constituées d'un ou plusieurs lipides différents. En l'absence de contrainte extérieure, l'aire de la membrane est donc considérée comme constante.
- Les fluctuations de la membrane génèrent des déformations dynamiques de courbure.

L'élasticité d'une membrane fluide fermée, sans contrainte extérieure, se résume donc uniquement au terme de courbure. Celui-ci est déterminé par trois paramètres : la rigidité de courbure (qui dépend de la nature des composants de la bicouche : rigidité et longueur des queues lipidiques, nature des interactions entre les têtes polaires, etc.), les courbures principales (mesurées localement en chaque point de la membrane), et enfin, la courbure spontanée (qui correspond à une éventuelle asymétrie dans la composition lipidique des deux feuillettes ou bien à la forme adoptée par la bicouche en l'absence de contrainte). En condition isotonique (même pression osmotique de part et d'autre de la membrane), les vésicules lipidiques ont une tension de surface de l'ordre de  $10^{-5} - 10^{-8} \text{ N/m}$ , très faible comparée à d'autres systèmes interfaciaux: par exemple, la tension de surface de l'eau est de  $72 \times 10^{-3} \text{ N/m}$ .

Elles se trouvent donc dans un régime où l'énergie de courbure domine, et sont très déformables, même sous une faible contrainte mécanique. Une bicouche plongée dans un milieu aqueux est soumise aux chocs des molécules d'eau en mouvement Brownien, ce qui provoque des ondulations de sa surface (figure C7). Au cours du temps, chaque point de la membrane est alors animé de mouvements rapides autour de sa position d'équilibre, à toutes les échelles de longueur. On parle de fluctuations thermiques, qui peuvent être réduites en mettant la vésicule sous tension. L'étude de ces fluctuations permet, entre autres, de mesurer le module de courbure d'une membrane, ou d'évaluer l'augmentation de la tension de surface par un événement qui perturbe les fluctuations (Kwok and Evans 1981).



**Figure C7: Ondulations thermiques de vésicules géantes observées en contraste de phase** (a) Vésicule montrant des fluctuations thermiques de grande amplitude (la tension de la membrane est quasi-nulle) ; (b) Vésicule tendue, de forme sphérique. Echelle = 10  $\mu\text{m}$ .

On peut mesurer la rigidité de courbure avec :

- des techniques basées sur l'analyse des fluctuations de forme de vésicules quasi-sphériques, qui combinent la détection du contour des vésicules avec une analyse de Fourier rapide des images. Les contours peuvent être suivis en microscopie à épifluorescence (Schneider et al. 1984), en contraste de phase (Grimm et al. 1997), (Dobereiner et al. 2003), (Pecreaux et al. 2004) ou en lumière pulsée (Meleard et al. 1997)
- des techniques qui étudient la réponse élastique des membranes à une déformation mécanique. Cette déformation peut être créée par aspiration dans une micropipette (Kwok and Evans 1981), par l'action d'un champ électrique alternatif (Kummrow and Helfrich 1991), (Meleard et al. 1998) ou d'un champ magnétique sur une vésicule remplie d'un ferrofluide (Gazeau et al. 1996), (Sandre et al. 2000).

Il est à noter que pour des vésicules constituées d'un même type de lipide, ces techniques ont donné des valeurs sensiblement différentes, restant toutefois autour de  $10^{-19}$  J. Le choix des paramètres d'analyse affecte grandement l'exactitude de ce genre de mesures.



# *Position du sujet*



## **Position du sujet.**

Le mécanisme moléculaire qui sous-tend la motilité cellulaire basée sur la polymérisation d'actine est très complexe car il met en jeu un grand nombre de partenaires protéiques *in vivo*. Une approche *bottom-up* permet de réduire le nombre de paramètres pour comprendre le rôle individuel de chacun d'entre eux. Le laboratoire de Marie-France Carlier a ainsi défini les protéines régulatrices nécessaires et suffisantes pour engendrer un mouvement par polymérisation branchée d'actine et a développé un système de motilité reconstituée *in vitro* dans lequel des billes de polystyrène fonctionnalisées par la protéine N-WASP sont propulsées dans un milieu composé de 5 protéines pures (actine, ADF, profiline, gelsoline et Arp2/3). Ce système biomimétique permet une approche moléculaire du mécanisme de production de force exercée sur une surface solide par polymérisation insertionnelle d'actine. Néanmoins, la situation dans la cellule est plus complexe puisque les activateurs d'Arp2/3 ne sont pas immobilisés sur un support solide, mais sont libres de diffuser à la surface de la membrane plasmique, qui est déformable. Pour être plus proche de la réalité, nous avons remplacé les billes par des liposomes synthétiques afin d'étudier l'interaction entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine, et analysé la propulsion par polymérisation d'actine de liposomes fonctionnalisés avec la protéine N-WASP ainsi que d'autres activateurs d'Arp2/3. Les expériences ont été conçues dans le but de répondre aux questions suivantes :

1) Comment l'interaction entre N-WASP immobilisé à la membrane et les filaments d'actine est-elle impliquée exactement dans la motilité ? Ces liens sont-ils transitoires ou permanents ? Peut-on agir sur les étapes élémentaires du processus de branchement des filaments pour contrôler la motilité ?

2) Comment la mobilité des activateurs N-WASP à la surface des vésicules affecte-t-elle la morphologie du réseau d'actine, le mécanisme de brisure de symétrie et d'établissement de la directionnalité du mouvement ?

3) Quel est le rôle de la déformabilité de la membrane dans la production de force ?

4) En quoi les systèmes des vésicules et des billes diffèrent-ils pour établir et maintenir la polarité du mouvement ?



# *Résultats*



# **Chapitre I : Mise au point du système biomimétique.**

Cette partie définit les paramètres de production rapide et sélective de vésicules géantes unilamellaires de diamètre compris entre 2 et 15 $\mu$ m. Ces vésicules sont préparées à partir d'un mélange de lipides contenant notamment des lipides contenant un groupe Ni-NTA permettant de fonctionnaliser les liposomes par des protéines munies d'une étiquette histidine. En particulier, la fixation de His-N-WASP permet d'activer le complexe Arp2/3 directement à la membrane des liposomes et d'induire la croissance d'un réseau de filaments branchés à la surface des vésicules. Je décrirai la préparation des vésicules par électroformation, puis l'optimisation de leur fonctionnalisation et enfin la composition du milieu de motilité dans lequel les vésicules fonctionnalisées sont placées.

## **I Synthèse de liposomes géants unilamellaires par électroformation**

### **1\*) Choix des lipides.**

Les liposomes sont synthétisés par électroformation (voir plus loin). Les lipides doivent être en phase fluide pour que le gonflement soit satisfaisant. La température à laquelle a lieu le gonflement doit être supérieure à la température de transition de phase  $T_m$  du lipide ayant la température de transition de phase la plus élevée du mélange de lipides utilisés. Nous nous placerons systématiquement à une température nettement supérieure à la température de transition afin de s'affranchir des effets prétransitionnels (Dimova et al. 2000). Les lipides DOGS-NTA-Ni sont les seuls lipides marqués au nickel disponibles commercialement. Les autres lipides qui composent le liposome doivent être miscibles avec les lipides DOGS-NTA-Ni afin d'éviter des séparations de phases conduisant à la formation de vésicules de composition hétérogène. La nature de la tête polaire, ainsi que la longueur et le degré d'insaturation des chaînes aliphatiques sont choisis pour que la température de transition de phase du lipide auxiliaire soit assez proche de celle du DOGS-NTA-Ni.

Malheureusement, le  $T_m$  du DOGS-NTA-Ni (Avanti Polar) n'est pas connu, on ne sait donc pas à quelle température réaliser l'électroformation. Il n'existe pas de relation simple permettant de mesurer le  $T_m$  d'un lipide A (ici le DOGS-NTA-Ni) à partir du  $T_m$  d'un mélange de deux lipides A+B en connaissant le  $T_m$  du lipide B (ici un lipide auxiliaire miscible avec le DOGS-NTA-Ni).

Cependant, comme c'est essentiellement la longueur et le degré d'insaturation des chaînes aliphatiques d'un phospholipide qui détermine la valeur de  $T_m$ , la solution la plus simple a consisté à choisir un lipide auxiliaire dont les chaînes aliphatiques ont une longueur et un degré d'insaturation voisins de ceux du DOGS-NTA-Ni.

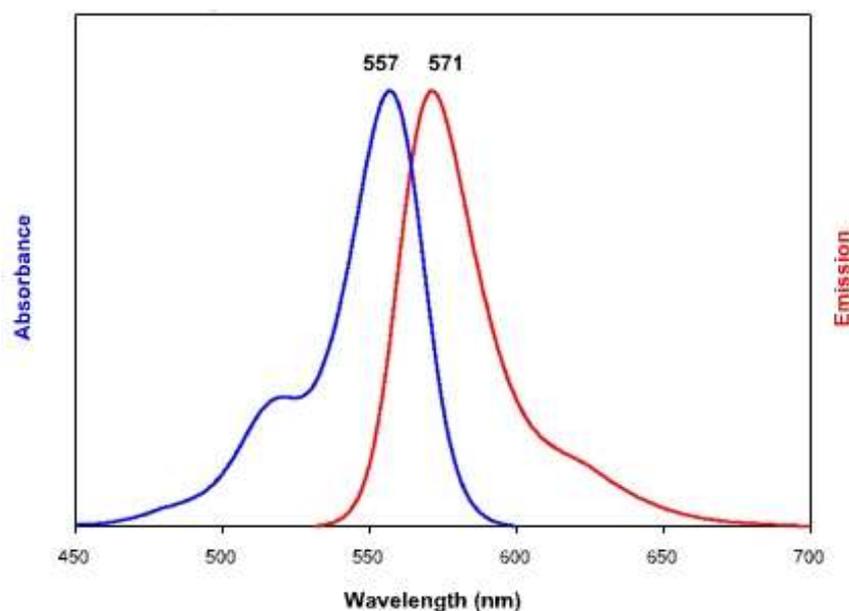
Un grand nombre de phospholipides garantissent à la fois une bonne miscibilité ( $T_m$  proches) et un gonflement optimal ( $T_m < \text{Température de gonflement}$ ), en jouant sur la longueur des chaînes et leur degré d'insaturation. Cependant, pour assurer une miscibilité optimale entre les différents lipides, il est préférable d'utiliser des lipides ayant des chaînes de longueurs voisines (3-4 carbones de différence au maximum)(Sophie Cribier, communications personnelles). Les chaînes saturées très courtes sont donc exclues. Ensuite, la présence d'insaturations rend la molécule plus fragile, plus réactive. Il est donc préférable d'utiliser des lipides possédant un faible nombre de liaisons insaturées. Ces limitations imposent le choix d'un lipide auxiliaire dont les chaînes aliphatiques ont la longueur et de degré d'insaturation de celle du DOGS-NTA-Ni : deux chaînes oléoyl. Le  $T_m$  devrait être très proche et la miscibilité satisfaisante.

Le DOGS-NTA-Ni contient deux chaînes aliphatiques identiques : deux chaînes oléoyl (9-cis-octodécanoïque selon la nomenclature IUPAC). Parmi les différents phospholipides possédant deux chaînes oléoyl (18 carbones avec une unique saturation), le DOPC a un  $T_m$  de  $-20^\circ\text{C}$  ; le DOPS a un  $T_m$  de  $-11^\circ\text{C}$  et la DOPE un  $T_m$  de  $-16^\circ\text{C}$ . La nature de la tête polaire n'a donc pas une grande influence sur le  $T_m$ . Il y a donc de grandes chances pour que le DOGS-NTA-Ni ait également un  $T_m$  assez bas. C'est vers un de ces trois phospholipides qu'il semble logique de s'orienter.

Reste donc à choisir la tête polaire, qui peut être chargée ou non. L'actine étant chargée négativement, l'incorporation de lipides chargés tels que la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG) ou encore l'acide phosphatidique (PA) pourrait causer des interactions artefactuelles entre la membrane et les filaments d'actine, c'est pourquoi j'ai choisi d'utiliser un lipide neutre. Traditionnellement, les phospholipides utilisés pour fabriquer des liposomes sont les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylcholines, qui sont des lipides zwitterioniques de charge globale nulle.

A température ambiante, les températures de transition de phase de la DOPC et de la DOPE sont toutes les deux très inférieures à la température ambiante donc le gonflement sera possible avec ces deux lipides. Néanmoins, à partir de 10°C, la DOPE subit une transition de la phase cristalline vers une phase hexagonale. Cette propriété fait de la DOPE un moins bon candidat que la DOPC pour assurer une miscibilité optimale avec le DOGS-NTA-Ni. J'ai donc choisi la DOPC comme lipide auxiliaire au DOGS-NTA-Ni dans les liposomes faisant l'objet de cette étude : son  $T_m$  faible (-20°C) assure un bon gonflement quelle que soit la température à laquelle il a lieu et le fait que les chaînes aliphatiques soient les mêmes que celles du DOGS-NTA-Ni garantit une excellente miscibilité. Par ailleurs, les propriétés de vésicules composées de DOPC ont été largement étudiées, ce qui est un atout non négligeable.

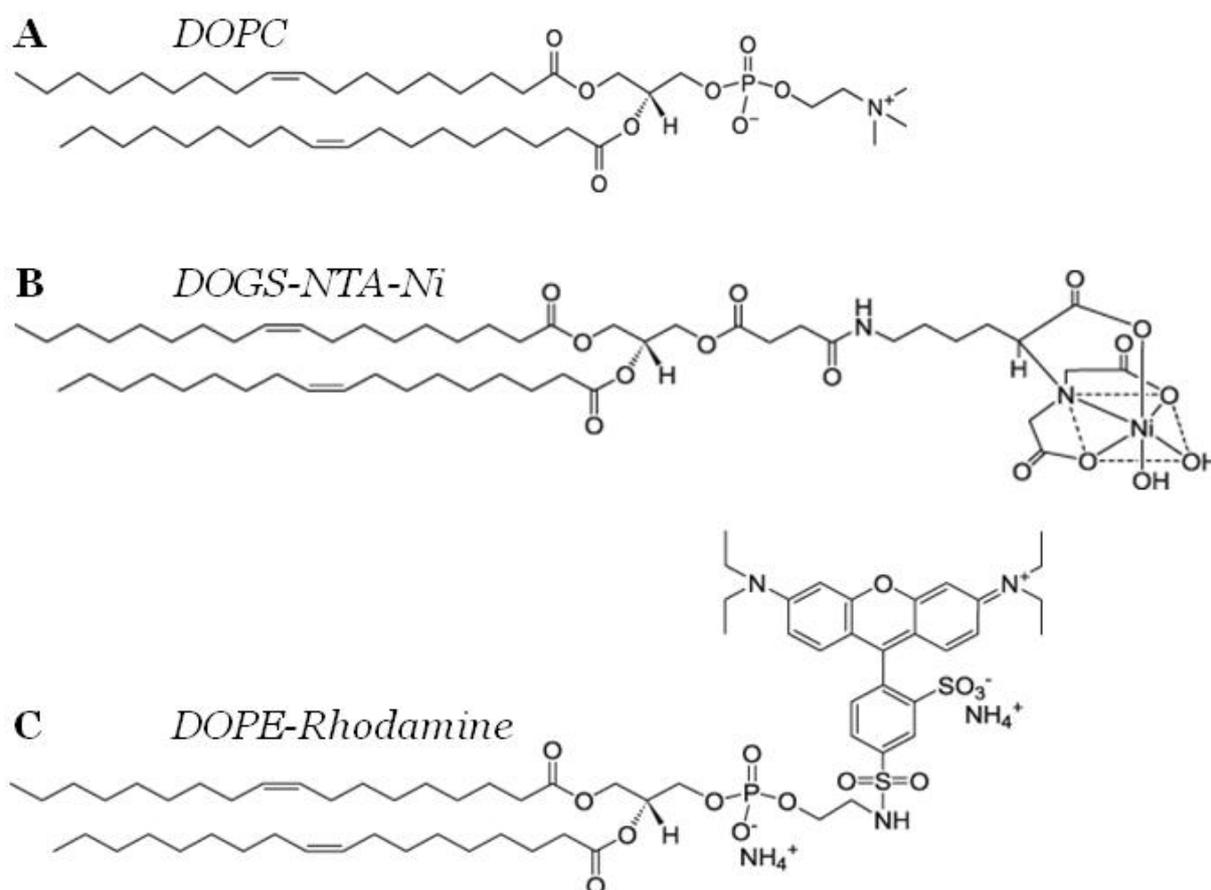
Dans certaines expériences, j'ai utilisé des lipides fluorescents pour marquer les vésicules afin de visualiser le contour des vésicules. Dans ce cas, on a donc un mélange ternaire de lipides. La sonde fluorescente peut être fixée à la tête polaire ou aux chaînes aliphatiques. Néanmoins, le choix de phospholipides couplés avec une sonde fluorescente utilisable en microscopie optique est restreint : la majorité des lipides fluorescents commerciaux sont marqués au NBD mais il existe des phospholipides marqués avec des dérivés de la fluorescéine (comme la rhodamine). Il n'existe pas de DOPC-Rhodamine ou de dérivé de phosphatidylcholine ayant un  $T_m$  voisin de la DOPC. Nous avons donc choisi la DOPE-Rhodamine (Figure I-1)



**Figure I-1: Spectres d'absorption et d'émission de la DOPE-Rhodamine**

En conclusion, les liposomes utilisés dans cette étude sont composés d'un mélange ternaire de lipides (Figure I-2 et Tableau 1)

- des lipides au nickel (DOGS-NTA-Ni)
- des lipides auxiliaires globalement électriquement neutres : DOPC
- des lipides fluorescents pour marquer les membranes : DOPE-Rhodamine



**Figure I-2: Formule des différents lipides entrant dans la composition des liposomes.**

**A :** DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) **B :** DOGS-NTA-Ni (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-([N(5-Amino-1-Carboxypentyl)iminodi Acetic Acid] Succinyl)(Nickel Salt))  
**C :** DOPE-Rhodamine (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl))

Lipide	Concentration de la solution stock	Masse molaire (Da)	% typique dans le mélange lipidique
DOPC	12,7mM	786.15	89%
DOGS-NTA-Ni	4,7mM	1057.02	10%
DOPE-Rhodamine	1,9mM	1301.73	1%

**Tableau 1: Masse molaire des lipides utilisés et concentration des solutions stock.**

## **2°) Gonflement de liposomes géants unilamellaires sous champ électrique.**

La méthode de gonflement spontané pour produire des liposomes géants implique des temps de gonflement très élevés (au moins 12 heures), et génère de très grandes quantités de liposomes multilamellaires et de débris lipidiques. La séparation des vésicules géantes unilamellaires des autres objets par sédimentation ou flottation dans des gradients de sucrose est difficile. Du fait des faibles rendements de purification, cette technique a été abandonnée au bénéfice de l'électroformation (gonflement sous champ électrique), qui permet d'obtenir sélectivement des liposomes géants unilamellaires (diamètres de 1 à 200 microns). Cette méthode, développée dans les années 1990 par M. Angelova (Angelova 1986; Angelova 1992) et améliorée ensuite par L. Mathivet (Mathivet et al. 1996), consiste à appliquer un champ électrique alternatif entre deux électrodes recouvertes d'un film de lipides séchés sous vide et mis au contact de la solution aqueuse. J'ai optimisé le protocole habituel pour accélérer le gonflement : celui-ci prend désormais une vingtaine de minutes au lieu de plusieurs heures auparavant.

### **a) Préparation et stockage des mélanges de lipides**

Les lipides sont commercialisés sous forme de poudre ou en solution. Selon le service technique d'Avanti Polar Lipids, il est préférable de conserver les lipides insaturés en solution et les lipides saturés sous forme de poudre pour assurer leur stabilité. En effet, les lipides insaturés conservés sous forme de poudre sont très hygroscopiques et l'humidité provoque leur hydrolyse ou leur oxydation. Les solutions mères de lipides dans le chloroforme sont conservées dans des fioles en verre scellées à -20°C. Les concentrations des solutions mères sont rappelées dans le tableau 1.

A partir des solutions mères de DOPC, DOGS-NTA-Ni et DOPE-Rhodamine (dont les concentrations sont résumées dans le tableau 1), on prépare un mélange de lipides en solution dans du chloroforme. Comme nous le verrons plus loin, la concentration totale en lipides d'un échantillon du mélange doit être comprise entre 7 et 10mg/mL.

Une fois les fioles de solutions mères de lipides ouvertes, le volume nécessaire à la préparation du mélange lipidique est prélevé au moyen d'une seringue Hamilton et le reste de la solution mère est transféré dans une fiole de type « Micro reaction Vessel » de 300 $\mu$ L (Supelco) équipée d'un système de fermeture « Mininert valve ». Ce système est équipé d'un dispositif d'ouverture et de fermeture muni d'un joint en téflon garantissant une fermeture hermétique et permettant de conserver les lipides dans de bonnes conditions.

Les fioles sont nettoyées à l'écouvillon avec une solution à 1% Liquinox chauffée (détergent ne contenant pas de phosphate), rincées abondamment à l'eau du robinet, puis à l'eau déminéralisée, deux fois à l'éthanol et enfin au chloroforme. Ces fioles sont à la fois utilisées pour stocker le mélange de lipides et les solutions mères après leur première ouverture. Afin d'éviter l'oxydation des lipides au cours du temps, les fioles sont au préalable remplies avec un flux d'azote. Comme les solutions mères, le mélange de lipides est conservé à -20°C.

### ***b) Préparation des lames d'ITO***

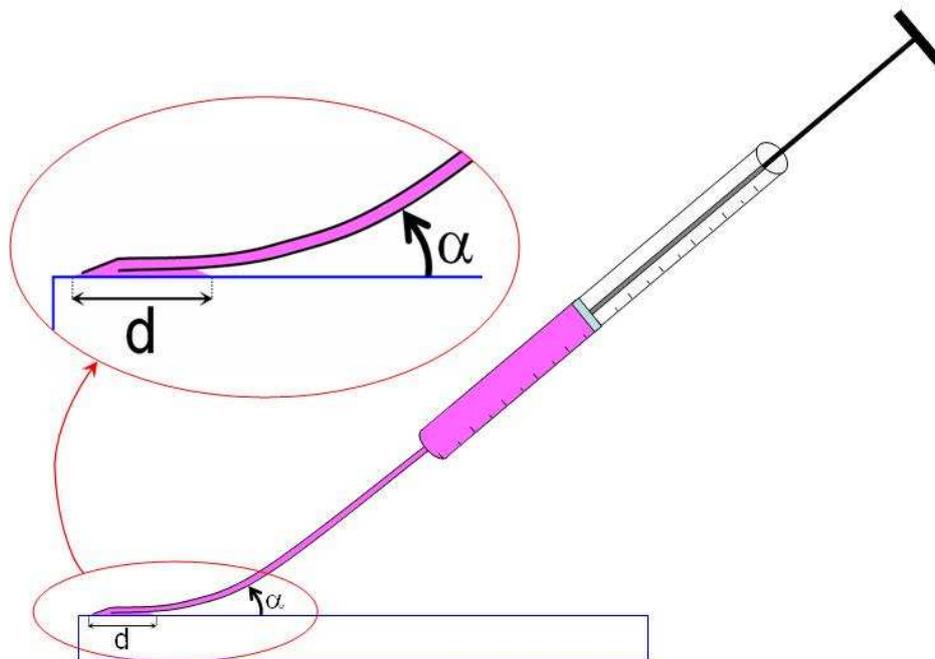
Dans notre montage expérimental, chaque électrode est une plaque de verre de 5cm de long sur 2cm de large pour une épaisseur de 1,1mm recouverte sur une seule face par une couche de 100 nm d'un matériau conducteur, l'ITO (Indium Tin Oxyde = Oxyde d'indium et d'étain). La face conductrice est identifiée par conductimétrie à l'aide d'un ohmmètre : sa conductivité est typiquement de l'ordre de 400 $\Omega$ .cm. Les bords longitudinaux de la lame sont érodés avec du papier de verre de manière à identifier facilement le côté conducteur et surtout à éviter tout effet de bord une fois les électrodes reliées au générateur de courant. Ensuite, on nettoie les lames successivement avec de l'eau, de l'éthanol et enfin avec du chloroforme. Entre chaque solvant, les lames sont séchées en les frottant avec un papier Kimwipes propre. Les lames ainsi nettoyées sont prêtes pour le dépôt de lipides.

### ***c) Dépôt des lipides sur les lames ITO.***

On dépose 10 $\mu$ L du mélange de lipides à ~ 10mg/ml au moyen d'une seringue Hamilton en verre munie d'un piston en téflon. Cette opération se fait sous sorbonne à température ambiante. Les rendements de production (quantité et taille moyenne des liposomes obtenus) sont meilleurs en déposant un film lipidique fin et homogène.

Cette étape est relativement délicate car elle demande beaucoup de précision : on commence par déposer une goutte d'environ  $2\mu\text{L}$  en haut de la lame puis on l'étale sur l'ensemble de la surface à l'aide de l'aiguille de la seringue qu'on applique latéralement sur le verre en la courbant (voir schéma), tout en continuant d'injecter le reste du mélange lipidique de manière à dessiner des bandes en zigzag. Le chloroforme s'évapore rapidement mais pas totalement ; c'est pourquoi les dernières traces de chloroforme devront être éliminées par évaporation sous vide.

L'aiguille est longue et surtout, elle est flexible. Pour que le dépôt soit fin et homogène, il faut à la fois contrôler la pression exercée sur l'aiguille et l'angle formé entre l'aiguille et la lame ITO (Figure I-3). Plus l'angle entre l'aiguille et la lame ITO est grand, plus la largeur des bandes sera faible. Au contraire, plus l'aiguille est plaquée contre la lame, plus la surface de contact sera grande et les bandes de lipides seront larges.



**Figure I-3: Dépôt des lipides sur les lames ITO avec une seringue Hamilton de  $10\mu\text{L}$ .**

La pression exercée sur l'aiguille permet également de contrôler la largeur des bandes et influence la qualité de l'étalement et du gonflement : plus on exerce une pression élevée sur l'aiguille, plus les bandes obtenues sont larges et de faible épaisseur. Lorsque la pression exercée sur l'aiguille devient si faible qu'il n'existe plus de contact direct entre l'aiguille et la lame ITO, les dépôts sont plus épais et l'évaporation du chloroforme lors de l'étalement est très lente. Le gonflement est alors souvent de moins bonne qualité.

Ceci peut être dû à une réorganisation défavorable du film lipidique lors de l'étape d'évaporation sous vide ou plus simplement à la plus grande difficulté pour éliminer le chloroforme emprisonné dans un film lipidique épais. En effet, le processus de mouillage des lames ITO par le mélange lipidique est difficile à maîtriser. L'expérience montre qu'il est préférable d'étaler rapidement en exerçant une légère pression sur l'aiguille, juste assez pour la courber pour dessiner des bandes d'environ 3-5mm de large. Le chloroforme s'évapore rapidement et les dépôts sont plus fins et plus homogènes. Les dépôts vraiment fins sont difficiles à réaliser car le chloroforme s'évapore très rapidement. Pour cette raison, il est préférable de refroidir les lames ITO avant de réaliser les dépôts, par exemple en les plaçant brièvement à -20°C. Cette étape joue sans doute un rôle dans les phénomènes de mouillage des lames par la solution et par conséquent sur l'arrangement des lipides à leur surface.

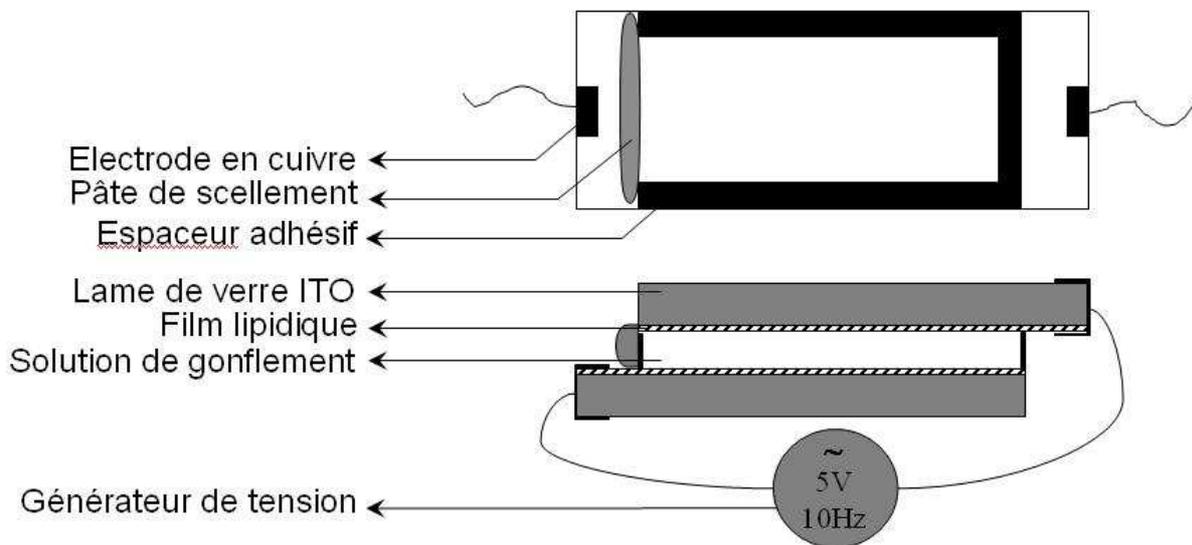
Pour que le dépôt soit aussi homogène que possible, il est préférable de ne pas exercer une pression trop élevée sur l'aiguille car cela génère des frottements donnant lieu à des à-coups qui se traduisent par des variations d'épaisseur du dépôt. La quantité de lipides déposée est contrôlée visuellement : la densité de dépôt des lipides idéale est de 7-10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> (dépôt de couleur mauve). Il est à noter que cette valeur est bien supérieure à la quantité de lipides traditionnellement utilisée dans les protocoles d'électroformation classiques. Ce point sera discuté plus loin.

Lorsque le dépôt a une couleur ocre / jaune, la quantité de liposomes obtenue est trop faible. Lorsqu'on dépose davantage de lipides (dépôt violacé), plusieurs générations de liposomes se forment, augmentant ainsi leur quantité. Lorsque la quantité de lipides déposés devient trop importante (dépôt de couleur bleu cyan), le gonflement est moins efficace. En conclusion, l'étalement des lipides doit se faire de manière à obtenir un dépôt de couleur mauve – violacée.

Une fois les lipides étalés sur les lames ITO, celles-ci sont placées sous vide pendant au moins deux heures pour éliminer toute trace de chloroforme. En effet, les solvants organiques dans lequel les lipides sont en solution altèrent les propriétés des membranes formées à partir de ces lipides. Le séchage dépend de la qualité du vide utilisé et de la taille de l'échantillon à sécher. Certaines études de la littérature recommandent une évaporation toute la nuit. Le service technique d'Avanti Polar recommande un séchage de 2-4 heures pour un échantillon de 1mL. Dans notre cas, les dépôts lipidiques ne font que 10 $\mu$ L pour chaque lame ITO et nous utilisons une pompe à vide générant un vide de 8mBar en quelques minutes. Nous pourrions sans doute nous contenter d'un temps d'évaporation plus court mais comme l'étape de séchage est très importante, j'ai choisi une durée d'au moins 2 heures.

#### **d) Assemblage de la chambre d'électroformation.**

Des espaceurs en forme de U d'environ 400 $\mu$ m d'épaisseur sont découpés au scalpel dont les branches font 3mm de large et les extrémités coïncident avec celles des lames ITO. En découpant les espaceurs différemment, la cellule de gonflement peut comporter un ou plusieurs compartiments, ce qui permet de réaliser différents essais simultanément. Ces espaceurs flexibles sont composés d'une couche de gel, d'une couche de polyester et une couche adhésive prises en sandwich entre deux couches protectrices : un film de polyéthylène et une couche de papier. Une fois les deux couches protectrices détachées, les couches adhésives de deux espaceurs sont placées face à face de manière à fabriquer un double espaceur d'une épaisseur d'environ 800 $\mu$ m dont les deux couches apparentes supérieure et inférieure sont les phases gels. Ces couches de gel adhèrent fortement aux lames ITO, ce qui garantit une bonne étanchéité à la cellule d'électroformation. La cellule est assemblée en plaçant les lames ITO face à face de manière à ce que la face recouverte de lipides de chaque lame ITO soit en contact avec l'espaceur et orientée vers l'intérieur de la cellule (Figure I-4). A ce stade, la cellule de gonflement est encore ouverte à l'une de ses extrémités pour permettre son remplissage avec la solution de gonflement. L'assemblage de la cellule de gonflement doit se faire rapidement car pendant ce temps, les lipides séchés sous vide sont à l'air libre et s'oxydent rapidement.



**Figure I-4 : La cellule de gonflement.**

### **e) Préparation de la solution de gonflement**

Le gonflement des liposomes au contact de solutions de très faible force ionique (par exemple solution aqueuse de saccharose ou du glucose à 500mM) est aisé, même à forte concentration. En revanche, le gonflement devient particulièrement difficile dans une solution saline : on ne peut guère dépasser une concentration de 10-15mM en sel. Pour cette raison, il n'est pas possible de faire gonfler des liposomes dans un milieu proche des conditions salines physiologiques (100mM KCl + 1mM MgCl<sub>2</sub>). Dans notre cas, la solution de gonflement possède une osmolarité de 300mOsm et elle se compose de 5mM Tris HCl pH 7,8, 0,01% NaN<sub>3</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, et 265mM saccharose.

A la fin du gonflement, la composition du milieu de gonflement est établie également à l'intérieur des vésicules. Pour assurer la conservation des vésicules dans ce tampon de gonflement à forte teneur en sucres, 0.01 % NaN<sub>3</sub> est ajouté afin d'éviter la prolifération bactérienne.

### **f) Remplissage de la cellule de gonflement**

La chambre de gonflement est remplie délicatement avec la solution de gonflement, préalablement filtrée sur 0,2µm, au moyen d'une seringue en plastique de 1mL munie d'une aiguille fine. Cette opération doit être réalisée avec minutie et sans à-coup afin d'éviter d'endommager le film lipidique lors du remplissage. Il faut également prendre soin à ne pas générer de fuite : un grand nombre d'échecs sont dus à un court-circuit survenant à cause d'une mauvaise étanchéité de la cellule de gonflement.

La cellule, une fois remplie, est fermée avec un boudin de pâte de scellement Sigillum Wax (Vitrex) qui résiste très bien au mouillage : elle adhère parfaitement aux lames ITO. Il faut prendre soin à ne pas générer de fuite de solution de gonflement en pressant sur la pâte de scellement pour les raisons mentionnées plus haut. Il faut aussi éviter de piéger des bulles d'air lors de la fermeture de la cellule. Enfin, il faut veiller à disposer le boudin de pâte de scellement de manière qu'il puisse être enlevé facilement après le gonflement pour pipeter les vésicules.

### ***g) Le gonflement***

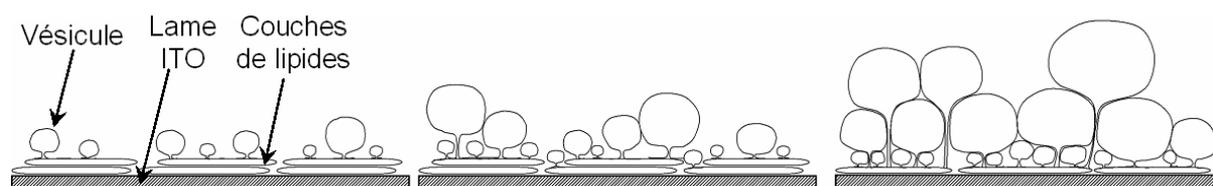
Une fois la cellule remplie, un champ électrique alternatif est établi entre les deux électrodes au moyen d'un générateur de tension. Les lames ITO sont connectées au générateur au moyen de feuilles de cuivre pliées en U qui enserrant leur extrémité (Figure I-4).

La fréquence optimale du champ électrique varie en ordre inverse de l'osmolarité de la solution de gonflement. Pour des solutions de l'ordre de 200 mOsm, la fréquence optimale est de 20Hz. Dans notre cas (Osmolarité de 300mOsm), la fréquence du courant sinusoïdal délivrée par le générateur est de 7,5Hz. L'amplitude du courant est de 4V. Les lames ITO se comportent donc comme des électrodes entre lesquelles règne un champ électrique  $E = U / d = 5V/mm$  où U est la tension imposée (4V) et d la distance entre les électrodes (0,8mm). Contrairement au protocole traditionnel d'électroformation, le voltage est ici directement établi à sa valeur finale : il n'y a pas de rampe progressive de tension.

La chambre de gonflement est placée sur la platine d'un microscope relié à une caméra, ce qui permet de suivre le déroulement du gonflement en direct en vidéo microscopie (contraste de phase). Quelques secondes après l'établissement du champ électrique, la couche supérieure du film lipidique se déforme et on voit apparaître de nombreuses vésicules de petite taille à la surface des électrodes (diamètre inférieur au micron) (Figures I-5 et I-6). En utilisant le réservoir de lipides déposé sur l'électrode, ces vésicules naissantes croissent rapidement et une fois leur taille suffisante pour se toucher, les vésicules voisines fusionnent entre elles pour donner naissance à des liposomes de taille croissante au cours du temps. Il suffit à tout moment d'interrompre le champ électrique pour arrêter le gonflement et fixer la taille moyenne des liposomes.

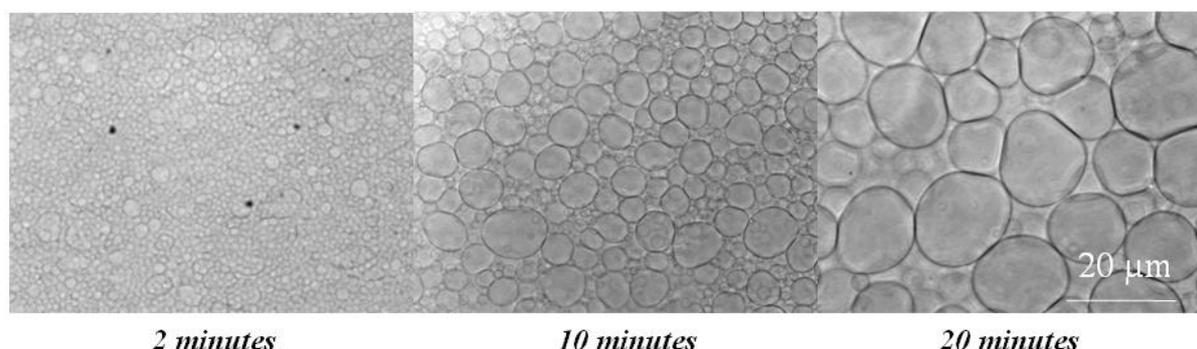
Au début du gonflement, il existe des zones plus riches que d'autres en vésicules. La surface des zones où se forment préférentiellement les vésicules augmente au cours du temps. Lorsque le gonflement est optimal, ces zones finissent par se toucher pour former un tapis de vésicules recouvrant toute la surface de l'électrode. Le fait que le nombre de vésicules formées par unité de surface ne soit pas le même sur l'ensemble de l'électrode est probablement dû au fait que l'épaisseur du dépôt lipidique et sa concentration en lipides ne sont pas homogènes.

Il est très probable que le film lipidique n'est pas constitué d'une seule bicouche de lipides mais plutôt d'un empilement de nombreuses bicouches dont l'organisation n'a pas encore été caractérisée. Au début du gonflement, les premiers liposomes se forment en utilisant les couches supérieures de lipides (les plus éloignées de l'électrode). Puis, lorsque les couches supérieures ont été consommées pour former les premières vésicules observables, c'est au tour des couches inférieures d'être utilisées pour générer de nouvelles vésicules. Ainsi, en se déplaçant selon un axe normal au plan de l'électrode, on constate qu'il existe plusieurs « générations » de vésicules. La couche de vésicules la plus éloignée de l'électrode correspond à la première génération de vésicules formées. Ces vésicules sont celles dont les diamètres sont les plus élevés car elles sont le fruit de nombreuses fusions successives. Plus on se rapproche de l'électrode, plus les vésicules sont petites. Lorsque le dépôt et le gonflement sont optimaux, on peut observer jusqu'à 6 générations de vésicules superposées. Lorsque le gonflement n'est pas très bon, il n'y a qu'une ou deux couches de vésicules.



**Figure I-5 : Représentation schématique d'un gonflement avec la formation de plusieurs couches successives de vésicules.**

Traditionnellement, la durée moyenne d'un gonflement classique est de 3 à 4 heures. Dans les conditions mentionnées ci-dessus, les gonflements ne durent qu'une vingtaine de minutes avec des concentrations de liposomes élevées.



**Figure I-6 : Déroulement d'un gonflement observé en vidéo-microscopie en contraste de phase. Au début du gonflement, il se forme un tapis de petites vésicules qui fusionnent entre elles pour donner des vésicules de tailles croissantes.**

### *Homogénéité du film lipidique*

Le gonflement de liposomes est un phénomène complexe : il n'est ni possible ni souhaitable de réaliser un film lipidique homogène sans défauts. Bien qu'un film lipidique fin et parfaitement homogène permette de générer des vésicules à partir des couches superficielles, en l'absence de défauts dans le film, on ne peut obtenir plusieurs générations de vésicules. Il a été établi que la présence d'irrégularités voire de petits objets tels que des billes de latex dans les couches de lipides favorise le gonflement des vésicules en augmentant la pénétration de l'eau dans le film (Dimitrov and Jain 1984), et en facilitant la courbure de la membrane vers un système fermé (Angelova 1986). Ces défauts proviennent de la nature du substrat : l'utilisation de surfaces rugueuses facilite le gonflement spontané. Ils proviennent également de la méthode de préparation du film. Dans notre protocole, les défauts proviennent de la forte épaisseur du dépôt dû à la grande quantité de lipides étalés : plus le film est épais, plus il présente de défauts, plus le gonflement est efficace, plus le nombre de fusions successives est élevé et plus les vésicules obtenues seront grandes. Indépendamment de la présence de défauts, une trop faible épaisseur du film lipidique (4-5 bicouches) empêche tout gonflement et à l'inverse, une trop grande épaisseur conduit à un gonflement anarchique. Pour cette raison, déposer de grandes quantités de lipides nécessite d'imposer un champ électrique plus fort. Non seulement on peut générer plus de vésicules (car on dispose de davantage de matériel), mais en outre le film lipidique est plus riche en défauts, ce qui améliore le gonflement. Utiliser un champ électrique intense impose d'utiliser des lames ITO assurant une bonne conduction du courant sans générer de court circuit, qui brûlerait les lames (couleur ambrée).

### *Effet des sels*

La présence de sels et leur nature affectent le gonflement. Le gonflement est plus aisé dans le NaCl que dans le KCl mais les ions monovalents ont globalement peu d'effet. En revanche, les ions divalents ou trivalents provoquent souvent des effets importants comme l'adhésion des vésicules entre elles pour former une mousse de vésicule, ou la vésiculation (Lipowsky 1995). En effet, les ions interagissent avec la tête polaire du lipide (Akutsu and Seelig 1981). Akashi et collaborateurs ont constaté que le gonflement spontané des vésicules géantes constituées d'un lipide zwitterionique est favorisé lorsqu'on ajoute au milieu de gonflement un sel comme le  $\text{CaCl}_2$  ou le  $\text{MgCl}_2$  aux concentrations optimales de 1mM  $\text{CaCl}_2$  ou 10mM  $\text{MgCl}_2$  (Akashi et al. 1998). En conclusion, la présence de faibles concentrations de calcium ou de magnésium a un effet positif sur le gonflement mais au delà de 1 mM les sels écrantent le champ électrique et empêchent le gonflement.

### *Charge des lipides et influence du pH :*

Bien que les lipides utilisés soient des zwitterions (globalement neutres), les surfaces membranaires obtenues à partir de ces lipides sont légèrement chargées négativement, probablement à cause de l'hydrolyse de quelques têtes polaires de lipides ou bien à cause d'un positionnement variable des têtes polaires avec la concentration en sel à l'origine d'une charge apparente non nulle : les membranes présentent ainsi un potentiel Zéta de -10 à -20 mV à faible force ionique (5mM) (Makino et al. 1991).

La plupart des lipides ont des têtes zwitterioniques ou chargées, ce qui modifie le comportement des lipides avec le pH. Ainsi par exemple, l'augmentation du pH provoque la vésiculation de GUVs avec des têtes PC. La phosphatidylcholine ayant un pKa voisin de 10, la charge globale peut être considérée comme nulle dans les conditions de pH utilisées (pH 7,8). En ce qui concerne la phosphatidyléthanolamine, les pKa des fonctions phosphate et amine sont respectivement de 1,7 et 9,8. A pH 7,8, la DOPE est très légèrement chargée négativement.

Les ions calcium s'adsorbent sur la membrane légèrement chargée négativement et lui donnent une charge apparente positive. La présence de charges dans la membrane est favorable au gonflement, probablement parce que l'interaction de la membrane avec le champ électrique ainsi que la répulsion électrostatique entre les couches de lipides sont d'autant plus fortes que celles-ci sont chargées (Marra and Israelachvili 1985). Par ailleurs, la présence de calcium favorise la fusion des vésicules en pontant les têtes polaires des lipides. Pour ces différentes raisons, les gonflements sont d'autant plus aisés que le film lipidique contient un pourcentage élevé de lipides chargés.

Néanmoins, tout comme le tampon de gonflement ne peut pas être fortement salin, on ne peut fabriquer des vésicules géantes par gonflement sous champ électrique qu'en dessous d'un pourcentage de lipides chargés de l'ordre de 30-40% lorsque la longueur des chaînes varie entre 16 et 18 carbones. Ainsi la production de GUV par gonflement sous champ électrique diffère de la préparation de LUV par extrusion ou par dialyse. Cette différence résulte probablement d'un effet de la courbure : l'aire des têtes polaires des lipides chargés est plus grande que celle des lipides zwitterioniques, c'est pourquoi ils s'incorporent plus facilement dans une membrane courbée (LUV) que dans une membrane quasiment plane (GUV) (Marra and Israelachvili 1985)

Lorsqu'on fait croître la proportion de lipides chargés négativement, le sel écrante d'abord la charge des lipides et anéantit tout gonflement. puis, au-delà d'une certaine concentration critique de charges négatives, il favorise à nouveau le gonflement. Pour cette raison la concentration de  $\text{CaCl}_2$  est élevée dans le tampon de gonflement. Le sel joue ainsi un rôle de promoteur de gonflement indépendamment de la quantité de lipides chargés.

### **Rôle du champ électrique**

Le champ électrique est utilisé de manière empirique : ses effets sur le gonflement sont mal compris mais il semble clair qu'il contribue à décoller les différentes couches de lipides et qu'il favorise leur hydratation. Plusieurs types de forces sont susceptibles d'y participer :

- Les forces d'hydratation qui courbent la bicouche : l'aire des têtes polaires exposées à la phase aqueuse passe de  $40$  à  $70\text{\AA}^2$ . L'étape d'hydratation est en général très rapide : il faut  $10^{-4}$  secondes pour augmenter la distance entre les couches de  $0$  à  $1\text{nm}$ . (Référence : Thèse Anne-Laure Bernard) Lorsque l'hydratation se fait moins bien ou qu'elle concerne plusieurs couches restant collées ensemble, on observe parfois la propagation du flux de liquide sous une couche : on voit le front de propagation de l'hydratation se déplacer longitudinalement à une vitesse de l'ordre de quelques centaines de microns par minute.
- Les interactions membrane-membrane et membrane-substrat de type électrostatique et van der Waals qui peuvent conduire à des séparations jusqu'à  $100\text{nm}$ .
- Les forces osmotiques et l'interaction avec le champ électrique qui peuvent induire une séparation de l'ordre du micron entre les bicouches.

On peut émettre différentes hypothèses pour expliquer l'effet du champ électrique :

Il semble clair que le champ électrique interagit avec la membrane. Par ailleurs, les contre-ions doivent être beaucoup plus sujets à l'action du champ électrique que la membrane elle-même du fait de son inertie. On peut supposer que le champ électrique redistribue les contre-ions de part et d'autre de chaque bicouche en attirant les contre-ions de l'autre côté de la membrane, ce qui aurait pour effet d'augmenter la répulsion d'une bicouche avec la bicouche voisine. Pourtant, le fait que certains lipides non ioniques forment des liposomes dans l'eau prouve que la présence de contre-ions n'est en tout cas pas nécessaire pour permettre le gonflement.

On peut aussi concevoir que le champ électrique crée une instabilité de courbure et facilite la formation de défauts facilitant le gonflement. Dans les conditions classiques de gonflement, cet effet est modéré puisque le potentiel transmembranaire créé par un champ de 10V/cm n'est que de 0,01mV. Pour créer des défauts conduisant à des pores dans une membrane, il faut plutôt des champs de l'ordre de 150V/cm. Or, l'intensité du champ électrique que j'ai imposée est beaucoup plus élevée que celles décrites dans les protocoles traditionnels d'électroformation de la littérature : 50V/cm au lieu de 0,5-1V/cm. Utiliser un champ électrique élevé comme dans notre cas tend donc à augmenter ce genre d'effet.

Enfin, même si le problème n'est pas entièrement résolu, l'hypothèse qui semble la plus probable est que le champ électrique génère un flux électro-osmotique : à basse fréquence, l'eau est dans un régime conducteur (Mitov 1993) et les charges sont susceptibles de se mettre en mouvement et générer des flux de solvant qui repoussent les différentes couches de membrane, que l'on peut voir vibrer à la fréquence du champ électrique (ceci est particulièrement visible à une fréquence de 1Hz). Ces va-et-vient de solvant imposés par la tension alternative produisent une agitation mécanique douce permettant le décollement du film lipidique, de la même manière que les ultrasons ou une agitation modérée ont un effet positif sur la formation de SUV et de LUV en gonflement spontané. Cependant, cette explication n'est pas suffisante pour expliquer qu'un mélange de lipides non ioniques puisse gonfler dans l'eau en absence de flux électro-osmotique et de charges dans le film lipidique et dans la solution de gonflement.

#### **h) Détachement des vésicules et extraction de la chambre de gonflement**

Les vésicules sont toutes connectées au réservoir de lipides à la surface de l'électrode : lorsqu'on photoblanchit avec un laser une région du tapis de vésicules fluorescentes, on observe un retour rapide de la fluorescence. On ne voit pas de vésicule en volume entre le tapis de vésicules de l'électrode inférieure et celui de l'électrode supérieure. Les vésicules sont connectées au film lipidique par l'intermédiaire d'un tube de membrane très fin qu'il faut rompre pour les fermer et les détacher afin d'obtenir une suspension de vésicules en volume. Pour rompre cette connexion à la fin du gonflement, on peut appliquer une légère vibration à la cellule de gonflement ou faire circuler une petite bulle d'air dans la cellule.

Cette technique est cependant assez violente pour arracher des morceaux de film lipidique qui contaminent la solution de vésicules. Il est donc préférable d'appliquer une tension carrée de 5V à 1Hz pour détacher les vésicules. Les vésicules liées à l'électrode inférieure « remontent » vers le centre de la cellule et se retrouvent en volume. Les vésicules des couches supérieures sont attachées au réservoir de lipides par l'intermédiaire d'un tube très long et donc très fragile, ce qui facilite leur détachement. En appliquant le champ électrique carré, on ne détache que les vésicules supérieures, c'est à dire les plus grosses. On obtient alors une suspension de liposomes de taille homogène et très élevée. Si l'on applique le champ plus longtemps, on détache les vésicules des couches inférieures de taille plus faible. On obtient alors une suspension plus concentrée en liposomes, dont la taille moyenne est plus faible et moins homogène. Si le gonflement a été optimisé pour générer au moins deux couches de vésicules, on détachera les liposomes en appliquant une tension carrée de faible fréquence. Cette technique marche mal s'il n'y a qu'une seule couche de vésicules. On sera alors contraint de créer un flux de liquide en faisant circuler la bulle d'air pour détacher les vésicules.

La taille des vésicules obtenues dépend du mode de détachement, et surtout de la durée du gonflement. 20-30 minutes suffisent pour obtenir des vésicules d'environ 10-20 $\mu\text{m}$ , il faut une heure pour atteindre des tailles d'environ 50 $\mu\text{m}$ . En prolongeant le gonflement plus longtemps, il est possible d'atteindre des tailles de plusieurs centaines de microns. Précisons que les vésicules sont d'autant plus fragiles et difficiles à manipuler qu'elles sont grandes. Une fois les vésicules détachées de l'électrode, la cellule de gonflement est ouverte en enlevant la pâte de scellement. Les vésicules sont pipetées en introduisant un cône de P1000 par l'ouverture ainsi dégagée. Le pipetage des vésicules doit se faire avec beaucoup de minutie et de patience : les vésicules sont très sensibles au cisaillement et donc aux frottements contre les parois du cône. Une fois extraites de la cellule de gonflement, les vésicules sont transférées dans un tube Eppendorf en plastique et conservées sur glace jusqu'à trois mois.

## **II Fonctionnalisation des vésicules**

Une fois formées, les vésicules sont fonctionnalisées en les incubant avec des protéines activatrices de la polymérisation d'actine. Ces protéines étant munies d'une étiquette histidine, elles sont recrutées à la surface des vésicules par l'intermédiaire des lipides DOGS-NTA-Ni.

### **1°) Nature de la protéine activatrice**

Plusieurs protéines activant le complexe Arp2/3 ont été utilisées pour fonctionnaliser les vésicules : N-WASP, VCA (partie constitutivement active de N-WASP), différents fragments de VCA (VCA tronqué) et VCA auquel un monomère d'actine a été couplé chimiquement à l'un des deux domaines WH2.

N-WASP & N-WASP Alexa488: Le N-WASP recombinant humain muni d'une étiquette Histidine est exprimé dans des cellules d'insectes (Laurent et al. 1999) puis marqué par l'Alexa488 maleimide selon un protocole identique à celui de l'actine Alexa488 (Wiesner et al. 2003)

VCA : Le VCA recombinant est exprimé dans E Coli puis purifié sur colonne Ni-NTA puis sur une colonne échangeuse d'ions S15a avant d'être marqué par l'Alexa488 maleimide comme décrit ci-dessus.

VCA ponté avec une actine monomérique : Il s'agit du fragment VCA dont un domaine WH2 a été ponté chimiquement avec un monomère d'actine.

VC : Il s'agit des résidus 392 à 484 de N-WASP. Le domaine acide A, dont le rôle est de stabiliser l'interaction avec le complexe Arp2/3 a été supprimé.

V : Il s'agit des résidus 392 à 458 de N-WASP dont la partie acide et la partie centrale ont été supprimées. Ce fragment correspond donc aux deux domaines WH2 de N-WASP et fixe l'actine G mais ne peut initier des filaments branchés par Arp2/3.

Note : Voir la figure A-11 page 19 pour un rappel des différents domaines de N-WASP

## 2°) Fonctionnalisation des vésicules et densité surfacique d'activateurs.

Pour chaque activateur d'Arp2/3, les conditions optimales de fonctionnalisation ont été déterminées. La densité surfacique d'activateurs présents à la surface des liposomes peut être modulée de différentes manières :

- la quantité de lipides Ni-NTA
- la concentration d'incubation d'activateurs
- la durée d'incubation

La solution la plus simple pour faire varier la quantité d'activateurs présents à la surface des vésicules est de faire varier la quantité de lipides nickel qu'elles contiennent. Néanmoins, comme nous le verrons plus loin, la gamme de concentration en lipides nickel pour laquelle les vésicules initient un mouvement de propulsion est relativement restreinte. Ainsi, dans les conditions usuelles, les vésicules utilisées contiennent 10% de lipides nickel. La recherche fine des conditions optimales de fonctionnalisation des vésicules se fait en jouant sur la concentration d'activateurs avec laquelle sont incubées les vésicules ainsi que la durée d'incubation. Malgré la forte affinité de l'étiquette histidine des activateurs pour le nickel, il reste certainement de l'activateur en solution à la fin de l'incubation, même en incubant longtemps. Toutefois, une concentration d'incubation de 25 ou 50nM d'activateur n'est pas suffisante pour fonctionnaliser les vésicules de manière à générer la croissance d'un réseau branché à leur surface. On considère donc que la fraction d'activateurs restant en solution dans le milieu de motilité est très faible et que leur effet est négligeable.

Ceci est surtout vrai pour N-WASP. En effet, N-WASP est un activateur très modeste d'Arp2/3 lorsqu'il se trouve seul en solution : pour être pleinement actif, N-WASP doit être activé par la signalisation (PIP2 et/ou Cdc42) ou accroché à une surface de manière telle qu'il soit dans sa conformation dépliée active (voir figure A-12 page 20). En revanche, VCA est constitutivement actif et il faut donc réduire au maximum la quantité de VCA restant en solution après incubation. On peut diluer d'avantage les vésicules après fonctionnalisation lorsqu'on les place dans le milieu de motilité. Toutefois, lorsque la concentration d'incubation est très élevée, cela imposerait de tellement diluer les vésicules que leur nombre s'en trouverait très réduit.

Une autre solution consiste à laver les vésicules après l'étape d'incubation en diluant le milieu extérieur avec une solution isotonique contenant du glucose tandis que l'intérieur des vésicules contient du sucrose. Comme le tampon de dilution est moins dense que celui de

gonflement, les vésicules sédimentent au fond du tube de dilution et on les récupère en pipetant la fraction inférieure. La vitesse de sédimentation étant relativement lente, il faut centrifuger la suspension de vésicules. En pratique, cette approche s'est révélée destructrice : les vésicules de grande taille sont très fragiles et une quantité importante de vésicules sont détruites au cours de la centrifugation, probablement par friction sur les bords ou au fond du tube. Il est possible de traiter les tubes de centrifugation pour diminuer la friction et optimiser les temps et les vitesses de centrifugation (Julien Heuvingh, communications personnelles).

Pour cette raison, j'ai choisi de ne pas laver les vésicules mais plutôt de les incuber avec des concentrations faibles d'activateurs (entre 250nM et 400nM) pendant des temps plus longs (2-3 heures) : cela permet de ramener la concentration d'activateurs restant en solution dans le milieu de motilité à un niveau faible et de garder un contrôle accru de la quantité de vésicules (moins de pertes). Les préparations riches en vésicules peuvent être incubées moins longtemps avec des concentrations d'activateurs plus élevées pour ensuite être diluées fortement dans le milieu de motilité : de cette manière, le nombre de vésicules à observer reste élevé et la concentration d'activateurs libres en solution reste faible. Ceci suppose que les activateurs ne sont pas en équilibre rapide entre un état lié à la membrane et un état libre

Enfin, pour maintenir constant le nombre de vésicules dans le milieu de motilité, il faut tenir compte de la concentration initiale en vésicules de la préparation brute après le gonflement. Après chaque gonflement, la concentration en vésicule de la suspension de vésicules est estimée. Concrètement, la préparation de vésicules est diluée 10 fois dans une solution isotonique contenant du glucose et les vésicules sont observées au microscope entre lame et lamelle. Un espaceur en parafilm maintient un espace suffisant entre lame et lamelle pour éviter la destruction des vésicules les plus grosses. Néanmoins, l'espace entre lame et lamelle est suffisamment faible pour que les vésicules sédimentent rapidement et il est possible d'estimer leur concentration par un simple comptage. La différence d'indice entre la solution de gonflement (saccharose) et la solution de dilution (glucose) augmente le contraste des vésicules : elles apparaissent noires en contraste de phase. Toutefois, certaines vésicules fuient, et ne présentent donc pas de différence de contraste.

En général, la préparation brute de vésicules est diluée entre 5 et 10 fois. Pour les raisons évoquées plus haut, il est préférable de disposer de préparations de vésicules concentrées. L'électroformation permet, plus que d'autres méthodes, de produire sélectivement des vésicules géantes unilamellaires avec des rendements élevés.

Pour résumer, les points essentiels de la préparation de vésicules sont les suivants

- 10% de lipides nickel
- 2 heures d'incubation des vésicules avec 400 nM N-WASP / N-WASP Alexa488 ou 250nM VCA / VCA Alexa488.
- Les vésicules sont en général diluées cinq fois lors de l'incubation avec N-WASP et dix fois avec VCA. Les vésicules fonctionnalisées sont encore diluées dix fois dans le milieu de motilité.

### **3\*) Calibration de la fluorescence des activateurs à la surface des liposomes: quantification absolue de la densité surfacique d'activateurs**

La fluorescence de N-WASP-Alexa 488 permet de visualiser et déterminer la quantité de N-WASP présente à la surface des vésicules. La calibration a été faite avec des billes recouvertes de N-WASP Alexa488 dont la densité surfacique est déterminée au moyen d'immunoblots quantitatifs pour établir la correspondance entre l'intensité de fluorescence mesurée au microscope et la densité surfacique d'activateurs. Une fois cette calibration réalisée, il suffit de mesurer l'intensité de fluorescence des liposomes fonctionnalisés avec N-WASP Alexa488 pour connaître la densité de surface en N-WASP Alexa488.

Pour mesurer avec précision la quantité d'activateurs recrutés par immunoblots, il faut travailler sur des quantités de matériel suffisantes (de l'ordre de la picomole) et donc que la surface disponible soit assez élevée. Même s'il est possible de concentrer des préparations de vésicules, la concentration de N-WASP fixé aux vésicules après centrifugation est inférieure à celle obtenue en centrifugeant une suspension de billes. Pour cette raison, utiliser des billes procure une meilleure sensibilité. Connaître avec précision la surface totale du support lipidique sur laquelle ces activateurs ont été fixés n'est pas facile car contrairement aux billes, les vésicules ont des tailles variables, il n'est pas possible de les centrifuger sans en perdre et elles sont contaminées par des débris lipidiques qui peuvent aussi fixer N-WASP, et qui sont comptabilisés dans les mesures de lipides totaux. Pour ces différentes raisons, j'ai choisi de déterminer la relation liant l'intensité de fluorescence à la densité de N-WASP à la surface des liposomes par comparaison de la fluorescence des vésicules avec celle de billes standard dont la densité en N-WASP a été mesurée.

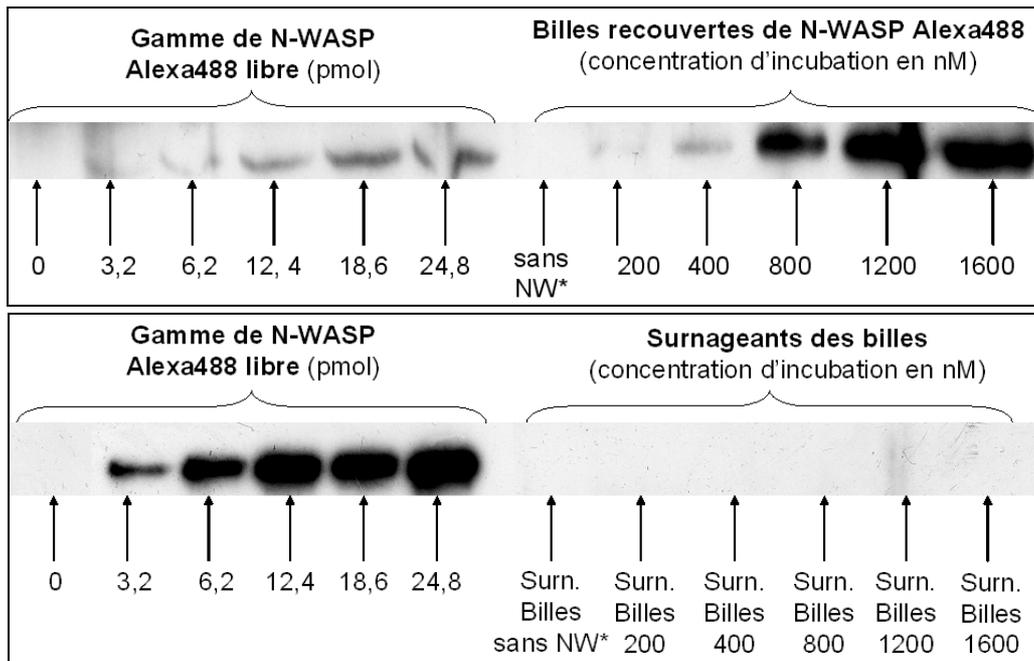
### ***Préparation de billes recouvertes de N-WASP Alexa488.***

Des billes de polystyrène carboxylées de 6µm de diamètre sont incubées avec des concentrations croissantes de N-WASP Alexa488. Concrètement, 15,2µL d'une solution de billes à  $2,1 \times 10^8$  billes/mL sont incubées une heure à 4°C sous agitation avec 0, 25, 50, 100, 150, 200, 400, 800, 1200 et 1600nM de N-WASP Alexa488. Le volume final est ajusté à 50µL par du tampon Xb. Après incubation, les billes sont centrifugées 10 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est prélevé pour mesurer la quantité de N-WASP libre. Le culot est resuspendu dans 50µL de tampon Xb à 1% BSA pour stopper l'adsorption ultérieure de N-WASP resté en solution. Les billes sont placées 20 minutes sous agitation de manière à les saturer de BSA. Ensuite, elles sont de nouveau centrifugées 10 minutes à 13 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 250µL de tampon Xb. Après un 3<sup>ième</sup> cycle de centrifugation, les billes sont resuspendues dans 50µL de tampon Xb à 0,1% de BSA avant d'être stockées sur glace (Figure I-8). Les billes sont utilisées dans la semaine qui suit leur préparation.

### ***Mesure de la quantité de N-WASP Alexa488 adsorbé à la surface des billes.***

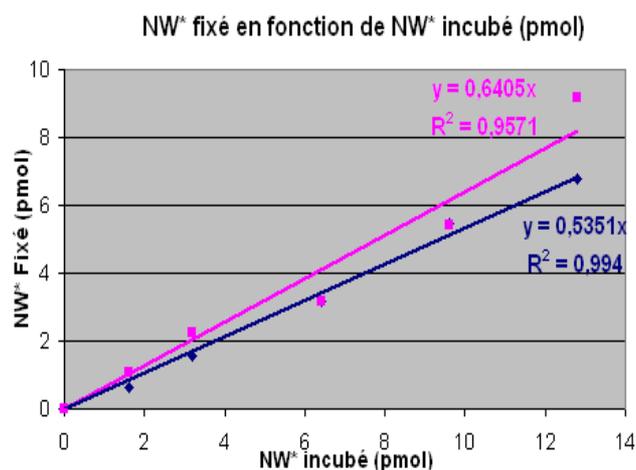
La fluorescence des vésicules utilisées en routine correspond à celle de billes incubées avec moins de 200nM de N-WASP Alexa488. Wiesner et collaborateurs ont montré que les billes recrutent l'intégralité du N-WASP (non fluorescent) avec lequel elles sont incubées jusqu'à ce que la saturation des billes soit atteinte, ce qui correspond à une densité de 20 N-WASP/100nm<sup>2</sup> (Wiesner et al. 2003). Dans un premier temps, nous avons incubé des billes avec différentes concentrations de N-WASP fluorescent pour s'assurer que tout le N-WASP Alexa488 incubé est bien recruté par les billes (Figure I-6)

La quantité d'activateur fixé par les billes est directement proportionnelle à la quantité d'activateur avec laquelle les billes sont incubées sans atteindre de plateau, ce qui signifie que la saturation n'est pas atteinte (Figure I-7). Par ailleurs, on voit que l'intégralité du N-WASP incubé n'est pas retrouvé dans le culot de billes. Comme il n'y a pas de N-WASP libre dans les surnageants des billes, cela signifie qu'une quantité importante de billes est perdue au cours des différentes étapes de lavage. En effet, la quantité de N-WASP dans les culots augmente lorsque les surnageants sont prélevés avec plus de délicatesse lors du lavage. Par ailleurs, en centrifugeant les surnageants, on culote une quantité importante de billes. On part donc du principe que tout le N-WASP incubé est recruté par les billes.

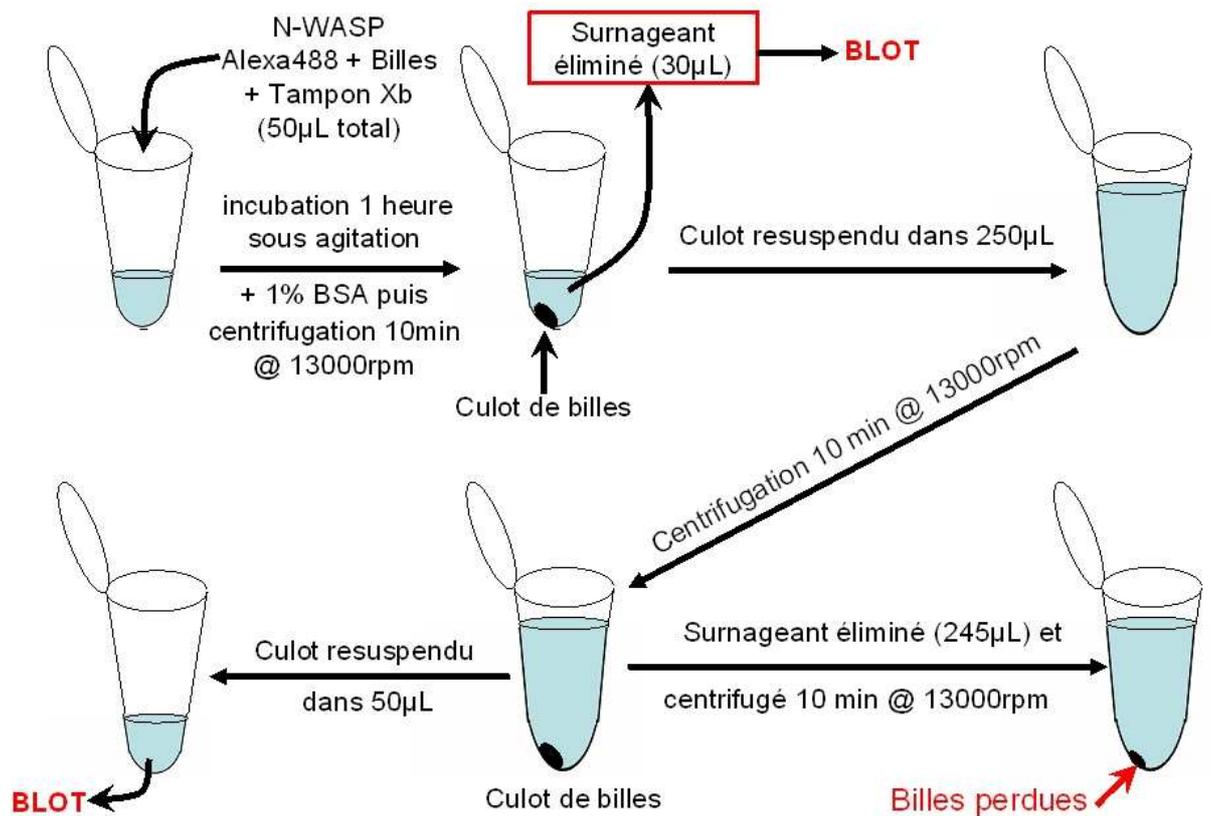


**Figure I-6 : Quantification du N-WASP Alexa488 adsorbé à la surface de billes au moyen d'immunoblots quantitatifs.**

Le gel du haut montre deux séries de mesures : à gauche, une gamme d'étalonnage réalisée avec des concentrations croissantes de N-WASP Alexa488 en solution et à droite le N-WASP Alexa488 accroché à des billes ayant été incubées avec différentes concentrations de N-WASP Alexa488. Le gel du bas reprend la même gamme de calibration avec du N-WASP Alexa488 en solution (à gauche) mais cette fois comparée au N-WASP Alexa488 retrouvé dans le surnageant du premier lavage, c'est-à-dire le N-WASP Alexa488 incubé avec les billes mais non immobilisé à leur surface (N-WASP libre). Bien que les deux gammes étalon de N-WASP libre aient été réalisées avec le même matériel, les bandes du gel du bas apparaissent beaucoup plus sombres car le temps d'exposition a été augmenté afin d'augmenter la résolution et pouvoir détecter la présence éventuelle de N-WASP en solution en très faible quantité dans les surnageants.

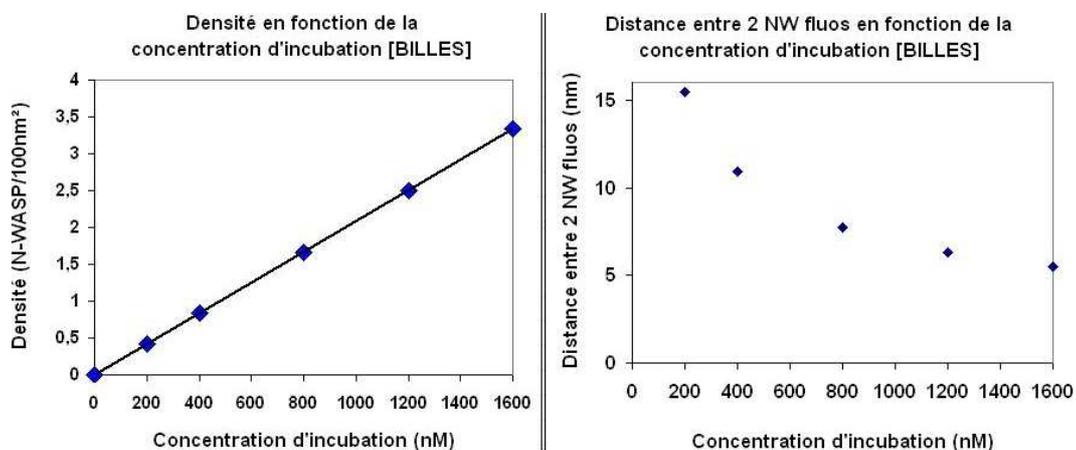


**Figure I-7: Quantité de N-WASP Alexa488 adsorbé à la surface des billes en fonction de la quantité de N-WASP incubé. La courbe bleue correspond à un premier essai et la courbe rose à un second essai où les surnageants des billes sont prélevés avec plus de délicatesse au cours des différentes étapes de lavage. Dans le deuxième cas on récupère plus de N-WASP dans le culot, probablement parce que moins de billes sont perdues.**



**Figure I-8 : Etapes de préparation et de lavage des billes.**

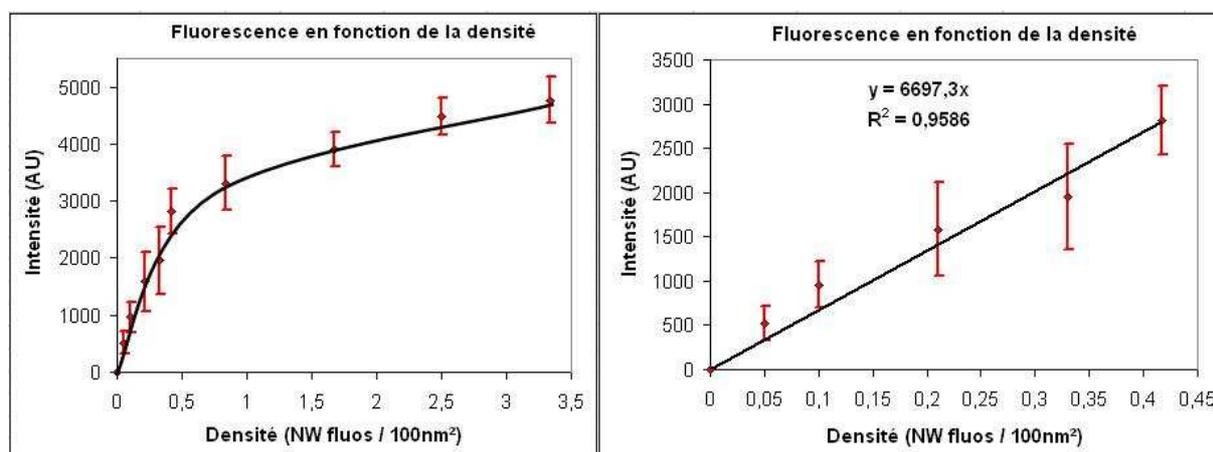
La quantité totale de billes étant connue, on déduit la densité surfacique des billes (nombre de N-WASP Alexa488 pour  $100\text{nm}^2$ ) en divisant la quantité de N-WASP Alexa488 adsorbé par la surface totale correspondante. On peut convertir ce résultat en termes de distance entre deux N-WASP Alexa488 à la surface des billes (Figure I-9). La saturation n'est pas atteinte et la distance entre deux N-WASP Alexa488 à la concentration d'incubation la plus forte est de l'ordre de 5,5nm. Ce résultat est à mettre en regard de la distance de 2 nm mesurée pour des billes saturées de N-WASP non marqué (Wiesner et al. 2003)



**Figure 1-9 : Densité surfacique des billes (nombre de N-WASP Alexa488 pour  $100\text{nm}^2$ ) et distance entre deux N-WASP Alexa488 à la surface des billes.**

### Mesure de la fluorescence des billes.

Une fois la densité surfacique d'activateurs à la surface des billes connue, la fluorescence des billes est observée au microscope pour établir la correspondance entre la densité surfacique de N-WASP et l'intensité de fluorescence. Pour cela, l'intensité dans le plan équatorial des billes est mesurée (figure I-10) :

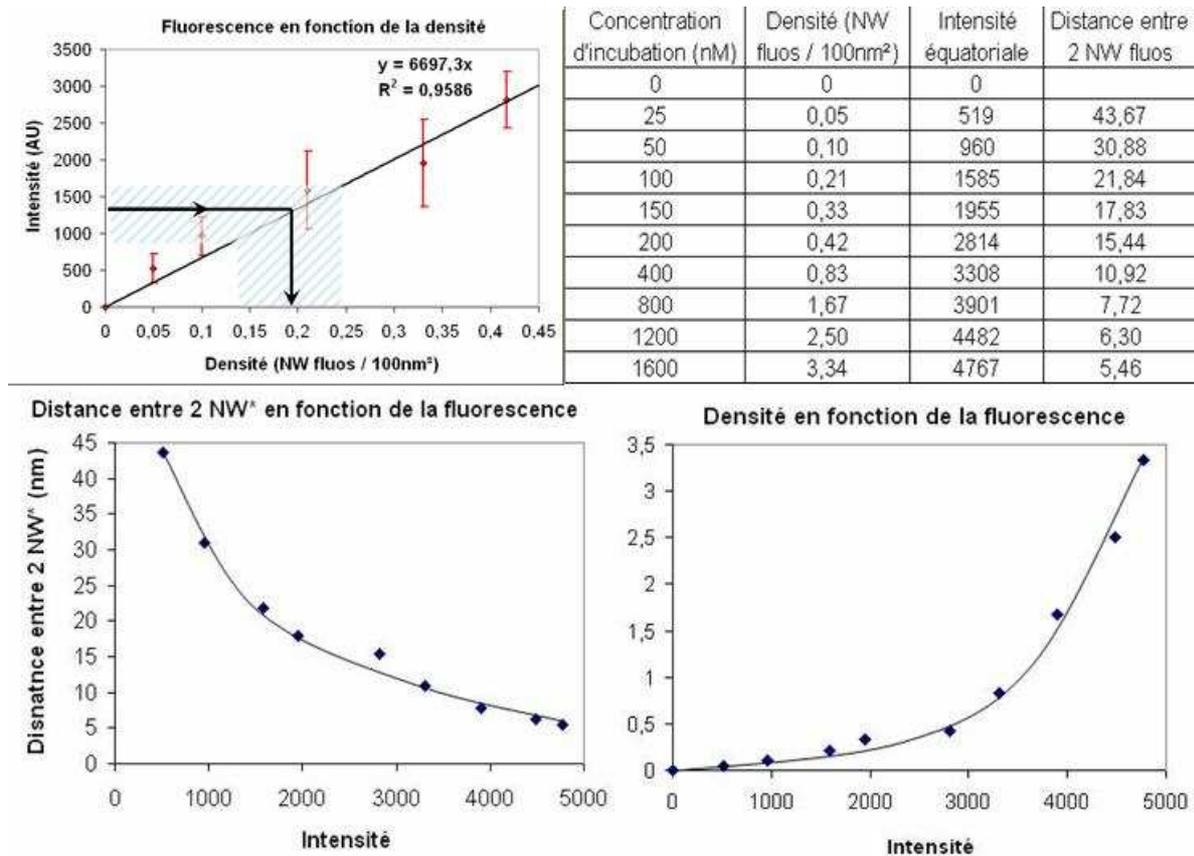


**Figure I-10 : Intensité de fluorescence des billes en fonction de la concentration de N-WASP Alexa488 avec laquelle elles ont été incubées.**

On voit que l'intensité de fluorescence ne dépend pas linéairement de la concentration de N-WASP Alexa488 avec laquelle elles ont été incubées. Ceci est probablement dû à un effet de quenching de fluorescence à partir d'une densité d'activateur importante.

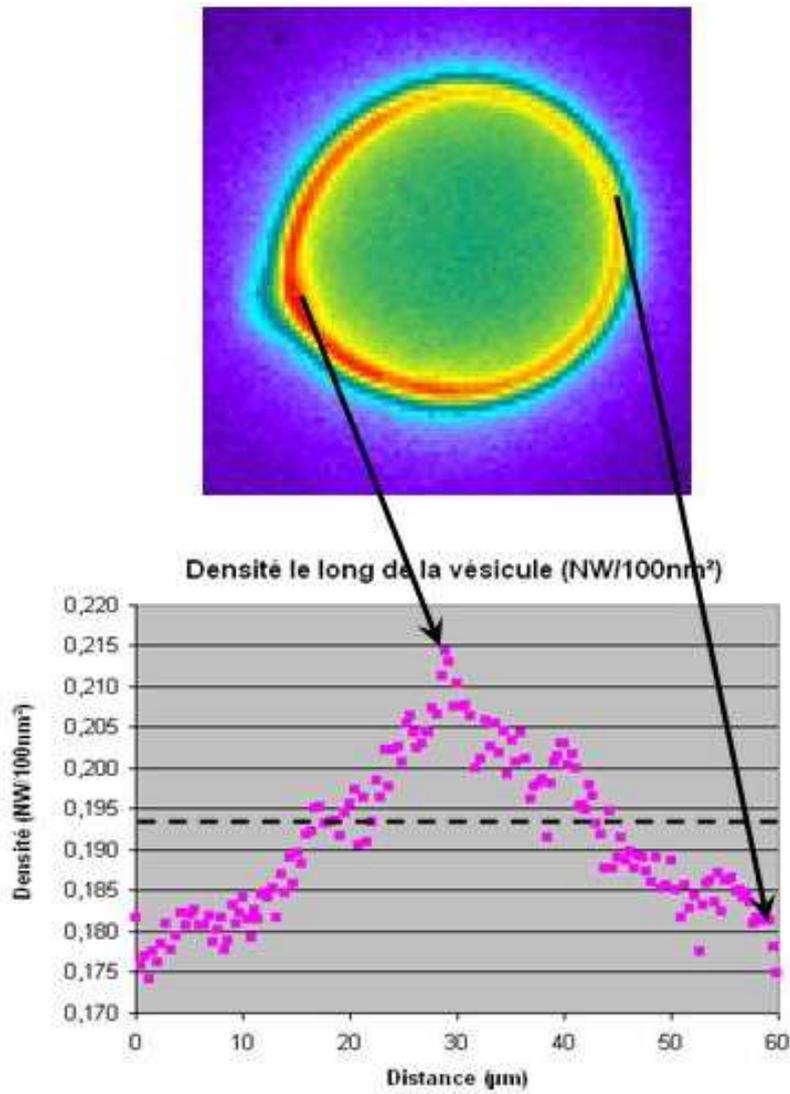
### Mesure de la fluorescence des vésicules et détermination de la densité surfacique de N-WASP Alexa488 présent à la surface des vésicules

Une fois la correspondance établie entre la fluorescence observée au microscope et la densité surfacique de N-WASP Alexa488 correspondante, il suffit de mesurer la fluorescence des vésicules pour connaître leur taux de couverture en N-WASP Alexa488 en utilisant la relation linéaire établie dans le domaine d'intensité de fluorescence qui nous concerne (Figure I-10)



**Figure I-11 : Calibration et estimation de la densité surfacique des vésicules en N-WASP Alexa488. En haut à gauche : la droite représente l'intensité de fluorescence mesurée en fonction de la distance moyenne entre deux N-WASP Alexa488 voisins à la surface d'une bille. Les domaines hachurés représentent les valeurs correspondant aux vésicules.**

Conclusion : La densité surfacique moyenne des vésicules est de  $0,19 \pm 0,06$  N-WASP Alexa488 /100nm<sup>2</sup>, soit une distance de 23nm entre deux N-WASP Alexa488 voisins. Ceci correspond à la densité surfacique de billes incubées avec 90nM N-WASP, ce qui correspond à un taux de couverture relativement faible (Figures I-11 et I-12)



**Figure I-12: Exemple de mesure de la densité locale absolue N-WASP fluorescent à la surface d'une vésicule. Sur cette vésicule, le maximum de densité est de 0,215 N-WASP / 100nm<sup>2</sup> soit environ 21nm entre deux activateurs alors que la densité minimale est de 0,17 N-WASP / 100nm<sup>2</sup> soit environ 24nm entre deux activateurs**

### **III Composition du milieu de motilité.**

#### **1°) Protéines**

##### **a) Actine**

L'actine est purifiée à partir de muscle squelettique de lapin sous sa forme monomérique Actine-G-Ca<sup>2+</sup>-ATP selon la procédure standard (Spudich and Watt 1971) à laquelle est ajoutée une dernière étape de gel-filtration sur une colonne Superdex 200HR dans du tampon G (5mM Tris HCl pH 7,8, 1mM DTT, 0,1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01% NaN<sub>3</sub>). L'actine est conservée sous forme filamenteuse en ajoutant 1mM MgCl<sub>2</sub> et 100mM KCl. L'actine est éventuellement marquée à la rhodamine-NHS (Isambert et al. 1995) ou à l'Alexa488 (Wiesner et al. 2003) Dans le milieu de motilité, la concentration d'actine est constante et fixée à 13,5μM.

##### **b) ADF/cofiline**

L'ADF recombinant est exprimé dans *E coli* (Loisel et al. 1999). L'ADF est conservé à -80°C dans un tampon contenant 10mM Tris, 50mM NaCl, 5mM DTT, 200μM EGTA et 0,01% NaN<sub>3</sub>. Bien que l'activité varie d'une préparation à une autre, la concentration optimale d'ADF pour la propulsion des billes est en général égale à 50% de la concentration d'actine (environ 7μM d'ADF dans notre cas). Toutefois, la concentration d'ADF est réduite à 4μM dans le cas des vésicules afin d'éviter la dépolymérisation trop rapide des comètes et pouvoir observer l'historique de propulsion.

##### **c) Gelsoline.**

La gelsoline recombinante est exprimée dans *E coli* (Loisel et al. 1999). La gelsoline est stockée à -80°C dans un tampon contenant 20mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EGTA et 0,01% NaN<sub>3</sub>. La concentration de gelsoline utilisée en routine est de 100nM et peut varier dans une gamme allant de 25 à 250nM

##### **d) Profiline**

La profiline recombinante est exprimée dans *E Coli*. La profiline est stockée à -80°C dans un tampon contenant 50mM Tris, 50mM KCl, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0,1mM EDTA. La concentration de profiline dans le milieu de motilité est constante et fixée à 2,4μM

### **e) Arp2/3**

Le complexe Arp2/3 est purifié à partir de cerveau de bœuf (Egile et al. 1999) et éventuellement marqué à l'Alexa488 (Wiesner et al. 2003). Arp2/3 est conservé à -80°C dans un tampon contenant 20mM Tris, 25mM KCl, 0,25mM DTT, 0,1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5mM EDTA. La concentration d'Arp2/3 couramment utilisée est de 50nM et peut varier entre 10 et 250nM.

### **2°) Sels.**

Le milieu de motilité contient 60 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> et 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. Le potassium et le magnésium permettent à l'actine de rester à l'état polymérisé dans des conditions de force ionique proches des conditions physiologiques. La présence de calcium est quant à elle requise pour l'activité de la gelsoline.

### **3°) ATP, DTT, DABCO, NaN<sub>3</sub>, méthylcellulose.**

Le milieu de motilité contient également 2 mM ATP, 1% (wt/vol) BSA, 0.1% (wt/vol) méthylcellulose, 0.01%NaN<sub>3</sub>, 1 mM DTT, 0.5 mM DABCO.

La polymérisation d'actine étant un phénomène dissipatif, la source d'énergie est l'ATP. La quantité d'ATP utilisée est élevée et n'est pas un facteur limitant.

Le DTT est un agent réducteur qui permet d'éviter l'oxydation des protéines du milieu de motilité. La concentration de DTT doit être inférieure à 1mM car le DTT déstabilise l'interaction entre l'étiquette histidine des activateurs et le groupement Ni-NTA des lipides.

Le DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) est un agent antioxydant qui augmente la durée de vie des fluorophores, qui peuvent être observés plus longtemps et/ou plus intensément en microscopie à fluorescence.

Le milieu de motilité des vésicules étant riche en sucre, l'ajout d'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), empêche la croissance des bactéries « Gram - », et de tous les streptocoques en bloquant les chaînes respiratoires.

La méthylcellulose est un polymère naturel dérivé de la cellulose et dont le rôle est d'augmenter la viscosité du milieu de motilité. Cela permet de réduire le mouvement brownien des objets étudiés et de réduire le flux entre lame et lamelle, facilitant ainsi leur observation en vidéo-microscopie.

#### **4°) Solution correctrice et contrôle de la pression osmotique.**

La survie et la stabilité des vésicules requièrent que la pression osmotique soit la même de part et d'autre de la membrane. Il faut donc contrôler la pression osmotique de la solution dans laquelle sont placées les vésicules et choisir judicieusement celle de la solution de gonflement. Comme la force ionique du milieu de motilité est proche des conditions physiologiques afin de maintenir l'activité des protéines telles que l'actine proche des conditions cellulaires, une force ionique minimum est requise. Une pression osmotique minimum du milieu de gonflement est nécessaire pour équilibrer les osmolarités internes et externes. Afin de disposer d'une marge suffisante pour tendre les vésicules (dilution hypotonique) ou les détendre (dilution hypertonique), la pression osmotique de la solution de gonflement a été fixée à 300 mOsm.

Outre les protéines (actine, profiline, gelsoline, Arp2/3 et ADF), des sels (KCl, MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub>) et les différentes espèces mentionnées plus haut (ATP, DTT, DABCO, méthylcellulose, NaN<sub>3</sub>), le milieu de motilité contient également du sucre (pour équilibrer les pressions osmotiques intra- et extra-vésiculaires), du Tris (pour tamponner le pH) et de la BSA (pour limiter l'adsorption des protéines sur les lames et lamelles, qui diminue la concentration des protéines disponibles en solution) (voir tableau 2).

J'ai choisi de regrouper dans une même solution stock le KCl, le MgCl<sub>2</sub>, la BSA et le sucre chargé de corriger la pression osmotique du milieu de motilité pour l'ajuster à celle de la solution de gonflement. Pour cette raison, je l'ai nommée « solution correctrice » (Tableau 3). Le « Mix » regroupe quant à lui le DTT, l'ATP et le DABCO. Le milieu de motilité est donc préparé en réalisant le mélange suivant : Méthylcellulose + Mix + Actine + Profiline + Gelsoline + Arp2/3 + ADF + Solution correctrice. Le volume est complété à 90µL avec du tampon de gonflement (G300). On dispose ainsi de quoi réaliser 10 essais de 10µL : pour chaque essai, on ajoute 1µL de vésicules à 9µL du milieu de motilité.

Espèce	Concentration de la solution stock	Pression osmotique de la solution stock	Volume pour 10 essais de 10 $\mu$ L	Concentration finale	Contribution à la pression osmotique finale
Methyl-cellulose	1%	<1mOsm	10 $\mu$ L	0,1%	1 mOsm
Mix	20 mM ATP 10 mM DTT 5mM DABCO	120mOsm	10 $\mu$ L	2 mM ATP 1 mM DTT 0.5mM DABCO	12 mOsm
Actine G	45 $\mu$ M	15 mOsm	30 $\mu$ L	13,5 $\mu$ M	5 mOsm
Solution correctrice	/	865 mOsm	25 $\mu$ L	/	216 moSM
Profiline	640 $\mu$ M	252 mOsm	0,4 $\mu$ L	2,4 $\mu$ M	1 mOsm
Gelsoline	4,2 $\mu$ M	341 mOsm	2,4 $\mu$ L	100 nM	8 mOsm
Arp2/3	5 $\mu$ M	111mOsm	1 $\mu$ L	50 nM	1 mOsm
ADF	157 $\mu$ M	135 mOsm	2,6 $\mu$ L	4 $\mu$ M	4mOsm
Tp G300	/	300 mOsm	8,6 $\mu$ L	/	26 mOsm
Vésicules	/	300 mOsm	10 x1 $\mu$ L	/	30 mOsm
Total	/		100 $\mu$ L	/	300mOsm

**Tableau 2 : Composition et contribution des constituants à l'osmolarité du milieu de motilité.**

Pour assurer la stabilité des vésicules, l'osmolarité de la solution correctrice a été ajustée de manière que l'osmolarité du milieu de motilité soit identique à celle du milieu encapsulé par les vésicules. Toutefois, une des variables manipulables est la différence de pression osmotique entre la solution extérieure et la solution intérieure. Lorsque les vésicules sont diluées dans un milieu d'osmolarité inférieure à celle du milieu interne (dilution hypotonique), les vésicules sont tendues parce que l'excès de surface dont elles disposent est utilisé pour résister à la compression due à la différence de pression osmotique. Lorsque les vésicules sont placées dans un milieu d'osmolarité supérieure à celui qu'elles contiennent (dilution hypertonique), les vésicules sont flasques car elles disposent d'un excès de surface supplémentaire.

Espèce	Concentration stock	Osmolarité de la solution stock	Volume ou masse	Concentration dans la solution correctrice	Contribution à l'osmolarité dans la solution correctrice
KCl	4M	8 Osm	600 $\mu$ L	240 mM	640mOsm
MgCl <sub>2</sub>	1M	3 Osm	80 $\mu$ L	8mM	24 mOsm
CaCl <sub>2</sub>	200mM	400mOsm	10 $\mu$ L	0,2mM	< 1mOsm
Tris	500mM	1,5 Osm	100 $\mu$ L	5mM	15 mOsm
NaOH	1M	2 Osm	100 $\mu$ L	10 mM	20mOsm
NaN <sub>3</sub>	10%	< 1mOsm	10 $\mu$ L	0,01%	< 1mOsm
BSA	/	< 1mOsm	400mg	4%	< 1mOsm
Glucose	/	< 1mOsm	620mg	310mM	325mOsm
Total	/		10 mL	/	665mOsm

**Tableau 3 : Composition de la solution correctrice pour 10 mL et contribution des différents constituants à l'osmolarité de la solution correctrice**

Il est couramment admis que les vésicules peuvent tolérer une différence de pression osmotique de l'ordre de 10% par rapport à leur osmolarité interne. Au delà de cette différence, les vésicules trop tendues rompent et les vésicules trop flasques bourgeonnent ou se disloquent. Comme il est mentionné dans (Boroske et al. 1981), il est courant lors d'un choc osmotique d'observer la présence de petites vésicules à la surface intérieure ou extérieure de la vésicule issues d'un « microbudding ».

Certains types de lipides sont plus sensibles que d'autres aux différences de pression osmotique selon leur perméabilité à l'eau : à température égale, plus le nombre d'insaturations sur les chaînes est important, plus la perméation à l'eau augmente (Olbrich et al. 2000). La nature de la tête influence aussi la perméabilité à l'eau: les phosphatidylcholines, ou les phosphatidylglycérols ont une perméabilité plus faible que les phosphatidylethanolamines ou phosphatidylserines ou les acides phosphatidiques (Jansen and Blume 1995). Plus la perméabilité à l'eau est grande, plus la vésicule sera à même d'équilibrer sa pression osmotique interne pour s'adapter à son environnement : elle fera rentrer de l'eau pour diminuer son osmolarité interne dans le cas d'une dilution hypotonique tandis qu'elle fera sortir de l'eau pour concentrer son milieu interne dans le cas d'une dilution hypertonique.

Tandis que la pression osmotique du tampon de gonflement est amenée à 300 mOsm avec du sucrose, la pression osmotique de la solution correctrice est ajustée avec du glucose. Si la masse de la membrane elle-même est négligeable, il est courant d'utiliser des solutés différents à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule pour augmenter le contraste des vésicules au microscope grâce à une différence d'indice. Bien que les milieux extra- et intra-vésiculaires aient la même osmolarité, ils n'ont pas la même densité : la masse molaire du sucrose étant plus faible que celle du glucose, les vésicules sédimentent au fond de l'échantillon entre lame et lamelle, ce qui facilite l'observation des vésicules, qui se trouvent toutes dans le même plan au niveau de la lame inférieure.

Cette technique est utilisée pour compter les vésicules après un gonflement pour estimer leur concentration : la préparation est diluée cinq fois dans un tampon isotonique dont l'osmolarité a été ajustée à 300mOsm en utilisant du glucose à la place du sucrose. Les vésicules sédimentent entre lame et lamelle. L'osmolarité de la solution correctrice est également équilibrée avec du glucose afin de faciliter le repérage des vésicules avant que le gel d'actine ait commencé à croquer à leur surface. Théoriquement, les vésicules devraient sédimenter dans le milieu de motilité au niveau de la lame inférieure mais en pratique, cet effet est très limité à cause de la présence de méthylcellulose dans le milieu qui augmente la viscosité du milieu extérieur et ralentit la sédimentation des vésicules : elles restent en volume loin des parois.



# **Chapitre II : Initiation du mouvement**

## **I Préparation des échantillons**

Une fois le milieu de motilité préparé, il est laissé 10 minutes à température ambiante pour que la polymérisation d'actine atteigne l'état stationnaire. Ensuite, on ajoute 1 $\mu$ L de vésicules fonctionnalisées à 9 $\mu$ L de milieu de motilité. Le mélange est homogénéisé délicatement au moyen d'une pipette munie d'une pointe tronquée puis déposé sur une lame de microscope à la surface de laquelle sont dessinés plusieurs canaux (entre 2 et 4) avec du crayon hydrophobe afin de réaliser plusieurs essais en parallèle. Les bandes de crayon hydrophobes sont assez épaisses : l'espace entre lame et lamelle est compris entre 80 et 100 $\mu$ m et les liposomes sont loin des parois, ce qui favorise leur préservation. La lamelle doit être posée très délicatement sur l'échantillon afin de ne pas détruire les vésicules. L'échantillon est ensuite scellé avec du VALAP (mélange vaseline, alanoline, paraffine 1 : 1 : 1 en masse). De cette manière, il n'y a pas d'évaporation au cours du temps et cela réduit également le flux dans l'échantillon.

La préparation est ensuite observée au microscope en contraste de phase et/ou en fluorescence avec un microscope Olympus AX-70 équipé d'un objectif x20 à air (pour le contraste de phase) ou avec un objectif x60 à immersion (pour la fluorescence). L'acquisition se fait avec une camera Hamamatsu ORCAII ERG pour la phase ou une camera Cascade II de Roper Scientific pour la fluorescence. La camera Hamamatsu possède une très bonne résolution avec une sensibilité correcte : elle est adaptée à l'acquisition en contraste de phase. La camera Roper est très sensible mais sa résolution est plus faible que celle de la caméra Hamamatsu : elle est davantage adaptée pour l'acquisition en fluorescence.

### **1\*) Croissance du gel initial**

Une fois les vésicules placées dans le milieu de motilité, elles s'entourent d'un gel d'actine qui croît progressivement et apparaît sombre en contraste de phase (Figure II-1). Dans les conditions standard, la croissance du gel d'actine est relativement lente et il existe un délai entre l'introduction des vésicules dans le milieu de motilité et l'apparition de la coque d'actine autour des vésicules observables en contraste de phase. Ce temps dépend de la nature de l'activateur, du taux de couverture, et des conditions biochimiques du milieu de motilité.

Habituellement, l'apparition du gel d'actine observable en contraste de phase se fait après environ 15 minutes après introduction des vésicules dans le milieu de motilité pour des vésicules N-WASP et après 30 minutes pour des vésicules VCA. Cette différence entre les deux activateurs peut s'expliquer par le fait que VCA est constitutivement actif, contrairement à N-WASP. Le système soluble VCA-Arp2/3 engendre la formation de filaments dont les bouts barbés sont libres dans le milieu, ce qui résulte en une valeur plus faible de la concentration stationnaire d'actine G. Logiquement on devrait remédier à ceci en augmentant la concentration de gelsoline. Cet effet dépend de la concentration de VCA restant en solution, qui dépend elle-même de la concentration de VCA dans le milieu d'incubation des vésicules et du degré de dilution des vésicules dans le milieu de motilité. Il faut donc veiller à ce que la concentration de VCA libre reste faible. Pour les vésicules N-WASP, ce genre d'effet est bien moins marqué et les vésicules s'entourent d'un gel d'actine plus rapidement.

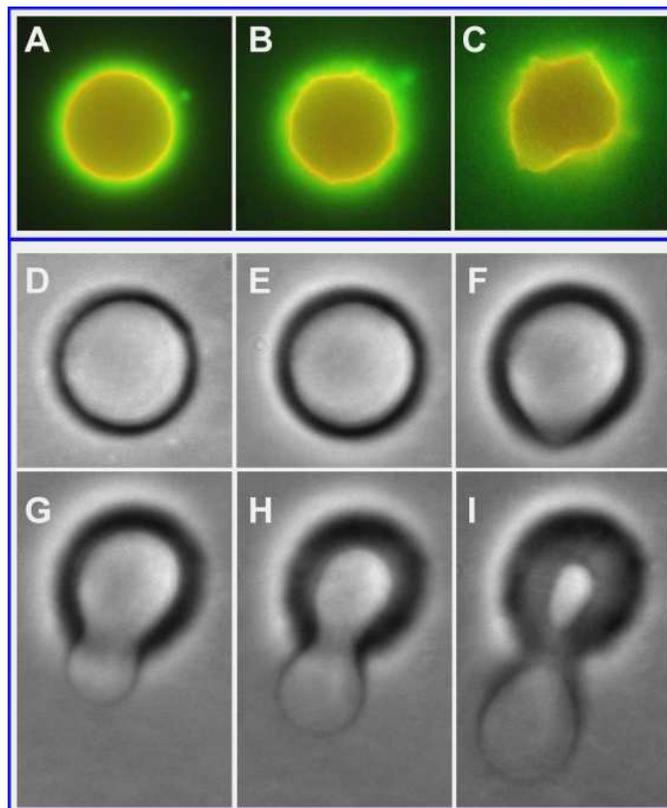
Pour être mises en mouvement, les vésicules doivent sortir de cette coque d'actine. Il est nécessaire pour cela que la coque d'actine brise sa symétrie, et s'ouvre.

## **2\*) Influence de la proportion de lipides nickel dans les membranes.**

La densité d'activateurs à la surface des vésicules influe sur la structure du gel d'actine et donc sur la brisure de symétrie. Comme cela a déjà été mentionné précédemment, la façon la plus évidente de modifier le taux de couverture en activateurs consiste à faire varier la proportion de lipides nickel présents dans la membrane. J'ai montré que la proportion de lipides nickel ne pouvait varier que dans une gamme assez restreinte pour que les vésicules parviennent à briser la symétrie et sortir de leur coque d'actine, et qu'il existait une proportion optimale de lipides nickel, de l'ordre de 10 %.

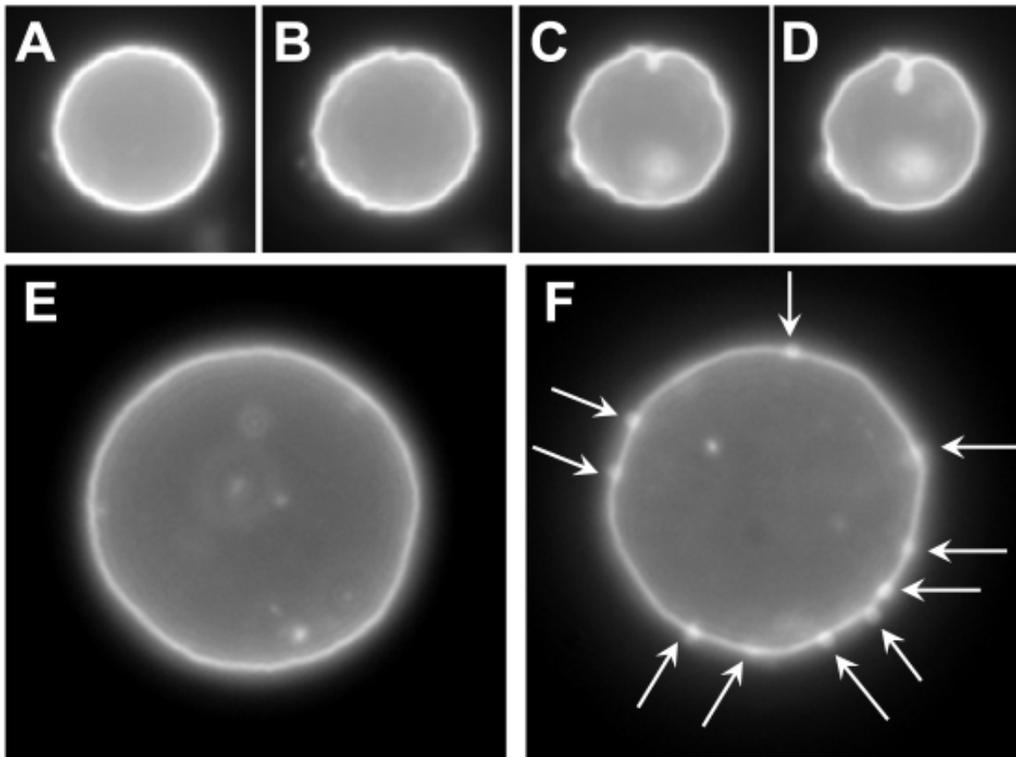
Lorsque la proportion de lipides nickel est faible (<5%), la densité surfacique d'activateurs résultante est insuffisante pour conduire à la brisure de la symétrie du gel d'actine qui précède l'initiation du mouvement de propulsion. Les vésicules s'entourent d'une coque d'actine qui croît lentement et reste homogène. Il n'y a pas de brisure de symétrie et donc pas de mouvement. Lorsque la proportion de lipides nickel est forte (>15%), de nombreuses vésicules ne parviennent pas à sortir du gel d'actine, qui est dense et qui ne s'ouvre pas. Il peut aller jusqu'à détruire ou fragmenter les vésicules (figure II-1).

Le gel d'actine croît souvent jusqu'à générer des contraintes supérieures à la limite de résistance mécanique de la vésicule, qui s'effondre sur elle-même (Figure II-1, A à C). Il est fréquent que la vésicule se scinde en plusieurs petites vésicules filles autour desquelles le gel continue de croître et dont elles parviennent à sortir. Un tel cas de figure n'est pas souhaitable car rien ne garantit que la composition lipidique et donc le taux de couverture des activateurs soit identique pour chaque vésicule. Il arrive aussi que la vésicule reste partiellement attachée au gel d'actine et qu'elle reste prisonnière de la coque d'actine. Dans des cas extrêmes, on observe parfois que la vésicule en train d'être expulsée est scindée en deux (II-1 D à I), probablement parce que la force due à la polymérisation de l'actine resoude les deux bicouches lipidiques. Il est aussi possible que des points de contact entre la membrane et le gel d'actine ne sont pas rompus, engendrant ainsi une résistance à l'expulsion. On observe aussi fréquemment l'apparition de petites vésicules à la surface intérieure ou extérieure de la vésicule probablement pour diminuer sa tension et donc l'énergie correspondante (Figure II-2)



**Figure II-1: Lorsque la proportion de lipides nickel est trop élevée ou que la vésicule ne parvient pas à briser la symétrie, la vésicule est susceptible d'être détruite**

*A à C : Vésicule de 4,3  $\mu\text{m}$  de diamètre observée en double fluorescence Lipides rhodamine + Actine Alexa488 (en vert) à différents temps au cours de l'expulsion et qui finit par rompre). Dans les cas extrêmes, on peut observer la fission de la vésicule. D à I : Séquence d'images d'une durée d'une heure en contraste de phase montrant l'expulsion d'une vésicule de 12  $\mu\text{m}$  de diamètre qui fissionne : une partie de la vésicule reste piégée à l'intérieur du gel d'actine tandis que l'autre partie s'échappe et forme une comète qui la propulse).*



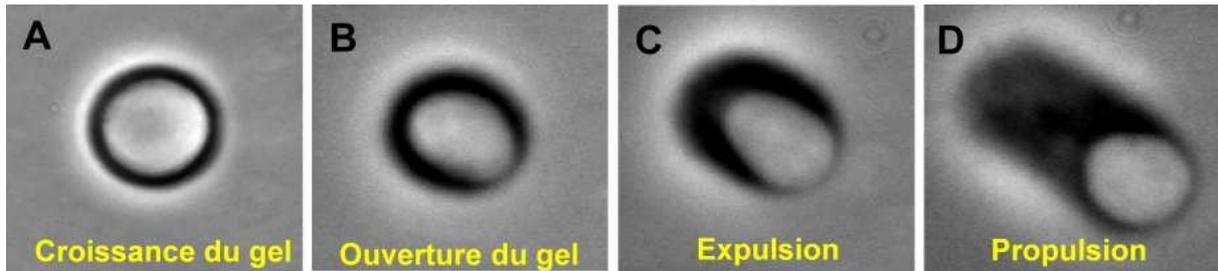
**Figure II-2 : Sous l'effet de la pression exercée par le gel d'actine en croissance, on voit fréquemment bourgeonner des petites vésicules filles à l'intérieur ou l'extérieur de la vésicule mère.**

*A à D : Bourgeonnement d'une vésicule à l'intérieur de la vésicule mère de 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. E, F : Formation de petites vésicules à la surface de la vésicule mère de 7  $\mu\text{m}$  de diamètre, observée avant (E) et pendant (F) la croissance du gel. Dans les 2 cas, les vésicules sont marquées avec des lipides fluorescents (DOPE-Rhodamine). Les flèches indiquent des vésicules filles bourgeonnant à la surface de la vésicule mère.*

### **3°) Brisure de symétrie et expulsion de la vésicule.**

#### **a) Déformation de la vésicule**

Le gel d'actine est initialement symétrique. Lorsqu'il atteint une épaisseur donnée (qui augmente avec le diamètre de la vésicule mais est généralement de l'ordre du micron), on voit apparaître une zone où le gel s'amincit au cours du temps. Au fur et à mesure que l'épaisseur de cette zone diminue, l'espace libéré est rempli par la vésicule, qui est déformée par les forces de compression exercées par le gel d'actine en croissance. Ces forces causent l'expulsion de la vésicule dans un processus où sa forme présente un étranglement au passage de la brèche dans le gel. La tension de la vésicule cause également un élargissement de ce pore (Figures II-1, II-3, II-4 et II-5)

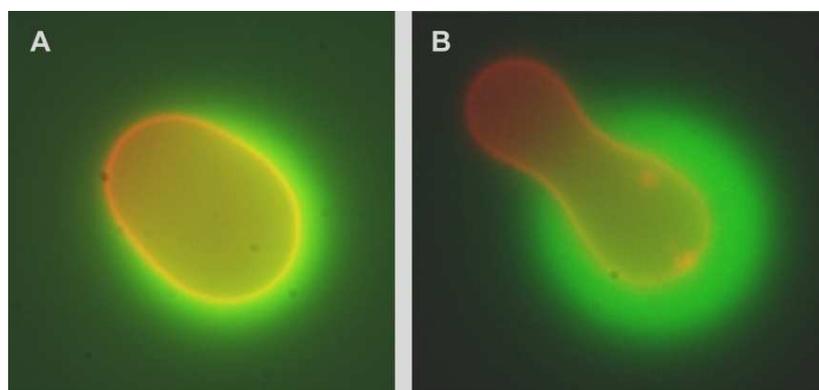


**Figure II-3: Expulsion d'une vésicule de 5,8  $\mu\text{m}$  observée en contraste de phase.**

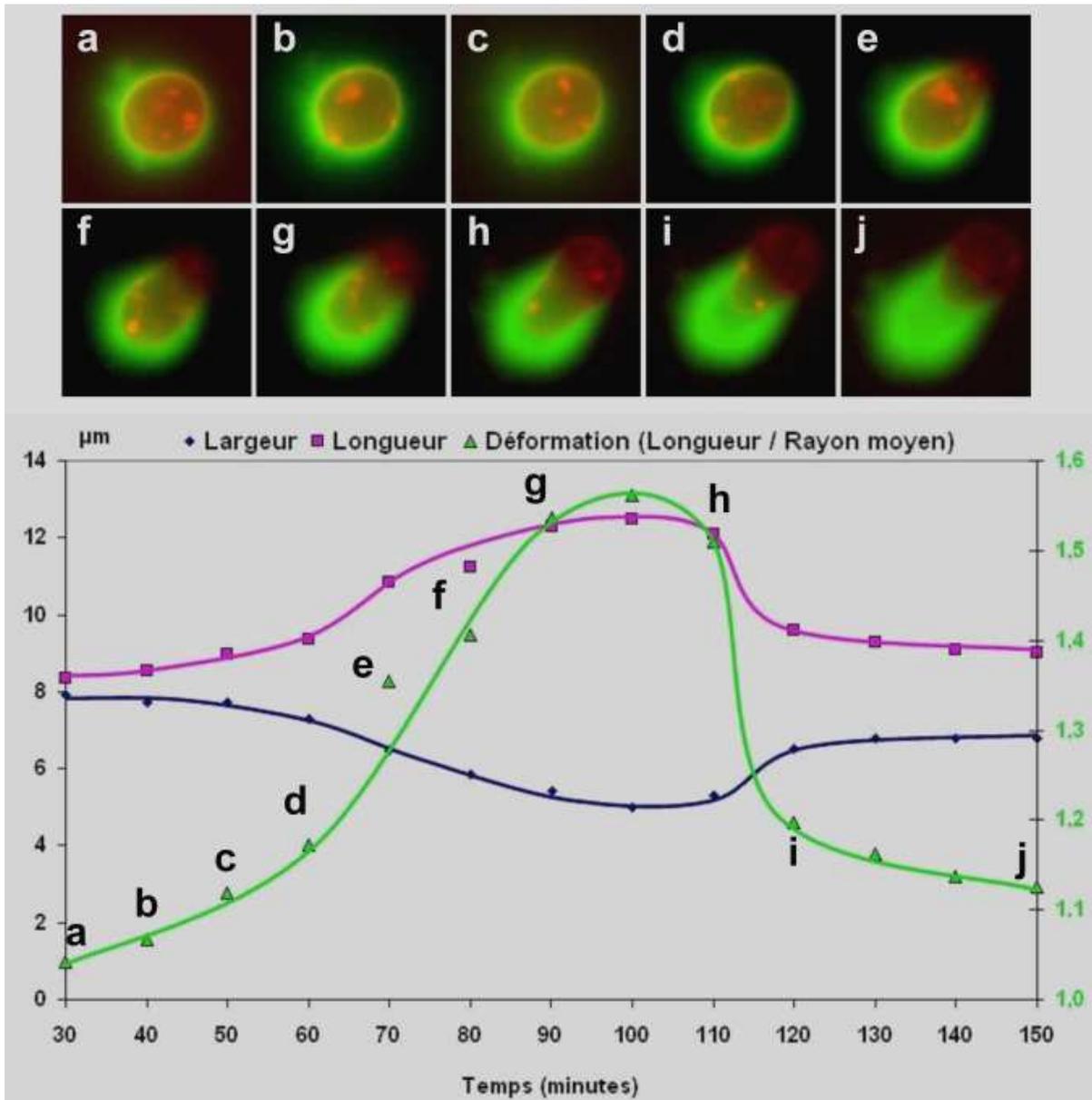
*Tout d'abord, un gel d'actine homogène croît autour de la vésicule (A). Ensuite, le gel s'amincit et s'ouvre en un point (B) par lequel la vésicule est expulsée (C) avant de former une comète d'actine qui la propulse (D). La vésicule s'allonge et adopte différentes formes (oblongue en C)*

Ce processus diffère assez nettement de la brisure de symétrie autour des billes où le gel d'actine craque d'abord à l'extérieur, là où les contraintes élastiques sont les plus fortes (van der Gucht et al. 2005) Toutefois, la densité de N-WASP à la surface des billes est au moins quatre fois plus élevée que pour les vésicules. Par conséquent, les propriétés physiques du gel sont probablement différentes : le gel autour des billes est plus réticulé et croît plus vite, ce qui peut avoir des conséquences sur la procédure d'expulsion. Néanmoins, il semble clair que lorsque les contraintes deviennent élevées, c'est le gel qui craque dans le cas des billes, tandis que c'est la vésicule qui casse du fait de sa fragilité si elle n'a pas réussi à briser la symétrie avant que les contraintes n'atteignent un niveau critique.

La forme de la vésicule au cours de l'expulsion varie d'un cas à l'autre et dépend essentiellement de la taille du pore par lequel elle est extrudée, de la taille de la vésicule ainsi que de sa déformabilité. Plus le gel est dense, plus le pore sera petit et difficile à agrandir, ce qui engendre des déformations spectaculaires (Figure II-4). Au contraire, lorsque la vésicule est petite et/ou lorsque le gel est moins dense, la vésicule est moins déformée.



**Figure II-4 : Images en double fluorescence Lipides Rhodamine (en rouge) + Actine Alexa488 illustrant l'expulsion d'une vésicule de 3,4  $\mu\text{m}$  adoptant une forme allongée et d'une vésicule de 6,4  $\mu\text{m}$  adoptant une forme de cacahuète au cours de l'expulsion.**



**Figure II-5 : Expulsion typique d'une vésicule de 8 µm de diamètre.**

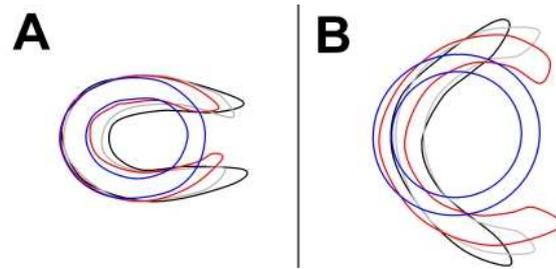
*Le gel d'actine s'ouvre en un point et la vésicule s'allonge jusqu'à être expulsée brutalement, étape au cours de laquelle elle retrouve sa forme initiale. En haut : séquence d'images en double fluorescence Lipides Rhodamine (en rouge) + Actine Alexa488 (en vert) montrant l'expulsion puis le début de la phase de propulsion de la vésicule. En bas : L'évolution de la longueur et de la largeur de la vésicule. La déformation de la vésicule est représentée par le rapport entre la longueur du grand axe de la vésicule et son diamètre au repos. L'observation a été réalisée dans des conditions d'observation où l'expulsion est particulièrement lente (environ 10 fois plus lentes que la normale). Les lettres correspondent aux illustrations en double fluorescence du haut de la figure à différents moments de l'expulsion.*

#### **4°) La brisure de symétrie s'accompagne d'une polarisation des activateurs.**

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, l'apparition d'une région où le gel d'actine est moins épais s'accompagne également d'une diminution locale de la densité d'activateurs à la surface de la vésicule. Cela favorise la brisure de symétrie car le gel d'actine croît moins rapidement au niveau d'une région présentant une sous-densité d'activateurs. En conséquence, cette région du gel devient mécaniquement de plus en plus faible par rapport au reste de la coque d'actine. La pression exercée par le gel sur la vésicule est distribuée de façon asymétrique, et la vésicule s'allonge en direction de la région la plus faible du gel.

##### **a) Comparaison avec la brisure de symétrie des billes**

La brisure de symétrie est beaucoup plus rapide pour les billes que pour les vésicules : elle intervient en quelques minutes pour les billes tandis qu'elle peut prendre entre 15 et 60 minutes dans le cas des vésicules. Cette différence est à la fois due à la différence de rigidité entre les deux systèmes et au fait que la densité d'activateurs est au moins quatre fois plus faible pour les vésicules que pour les billes. Non seulement le gel croît plus lentement autour des vésicules mais comme le mécanisme de branchement est auto-catalytique, les différences de densités d'actine à la surface de la vésicule vont mettre plus de temps pour s'amplifier au cours du temps. Dans le cas d'une vésicule, la présence d'inhomogénéités dans la distribution de N-WASP à la surface ainsi que dans le gel va se traduire par l'ouverture progressive d'un pore au sein de celui-ci. La vésicule va alors se déformer peu à peu selon un processus continu. Dans le cas d'une bille, le gel d'actine est plus dense lors de sa rupture, qui est alors beaucoup plus brutale. En se déformant, la vésicule emmagasine donc une partie des contraintes élastiques générées par la croissance du gel d'actine, tandis que dans le cas d'une bille ces contraintes s'accumulent uniquement dans le gel d'actine. Lorsque la vésicule est expulsée de la coque d'actine, la libération des contraintes accumulées se traduit par la relaxation de la vésicule, qui reprend sa forme sphérique. Quant au gel d'actine, il ne relaxe quasiment pas pendant et après l'expulsion : il reste relativement fermé et conserve sa forme en croissant de lune. Dans le cas des billes, la relaxation des contraintes élastiques accumulées dans le gel d'actine donne lieu à la déformation de celui-ci : il s'ouvre largement au cours de l'expulsion, et continue de le faire après le départ de la bille (Figure II-6).



**Figure II-6 : Schéma représentant la forme, déterminée par microscopie à contraste de phase, du gel formé par une vésicule (A) et par une bille (B) avant l'expulsion (en bleu), au cours de l'expulsion (en rouge puis en gris) et après l'expulsion (en noir). Le gel formé par une vésicule ne relaxe pas pendant et après son expulsion, tandis que le gel formé par une bille s'ouvre et continue de s'ouvrir après l'expulsion. Pour la vésicule comme pour la bille, il s'agit ici d'une expulsion observée lors d'un mouvement saltatoire, qui est analogue à l'expulsion que l'on observe lors de la brisure de symétrie initiale.**

***b) Proportion de vésicules formant des comètes.***

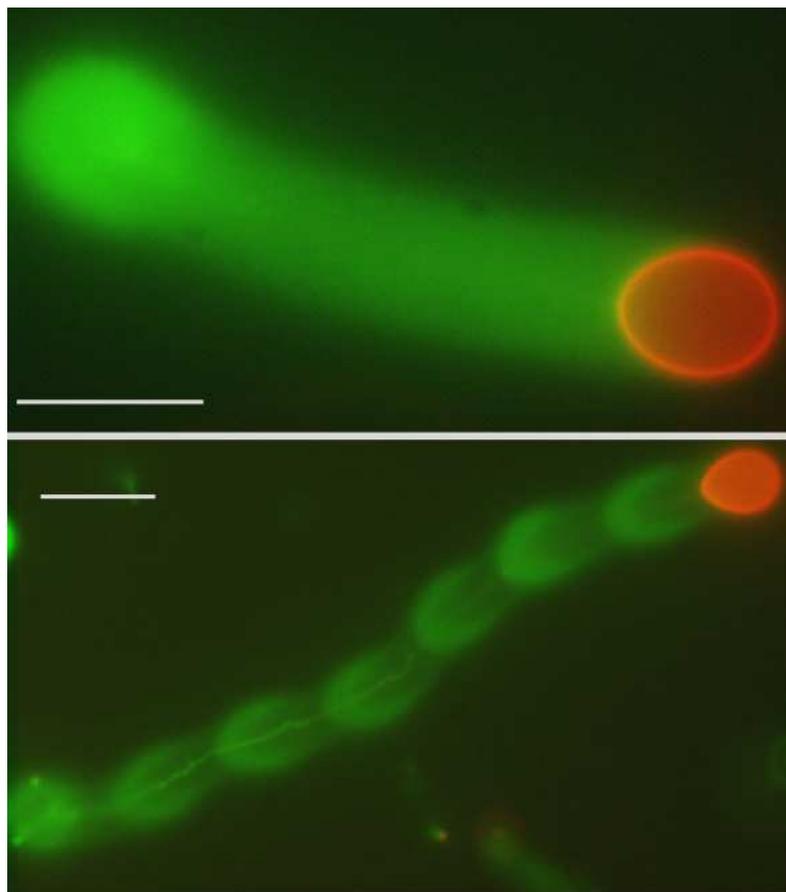
Dans les conditions de fonctionnalisation optimales pour chaque système, quasiment toutes les billes forment des comètes tandis que c'est le cas pour seulement deux tiers des vésicules. Il a été montré que la proportion de billes formant des comètes dépend fortement de la densité d'activateur et de la concentration de gelsoline (Wiesner et al. 2003). Pour des densités d'activateurs élevées ( $\sim 10$  N-WASP/100nm<sup>2</sup>), toutes les billes forment des comètes. Pour une densité d'activateurs de l'ordre de 0,8 N-WASP/100nm<sup>2</sup> (soit une densité 2,5 fois inférieure aux conditions de fonctionnalisation habituelles pour les billes, mais 4 fois supérieure à la densité d'activateurs sur les vésicules), la proportion de billes formant des comètes diminue fortement lorsque la concentration de gelsoline augmente : 100% pour 50 nM de gelsoline, environ 70% pour 100 nM de gelsoline et moins de 50% pour 200 nM de gelsoline. Comme les vésicules sont faiblement recouvertes ( $\sim 0,2$  N-WASP/100nm<sup>2</sup>) et que la concentration de gelsoline de leur milieu de motilité est de 100 nM, il n'est pas surprenant que les vésicules ne forment pas toutes une comète. La proportion de billes formant des comètes dans les mêmes conditions serait certainement plus faible.

La différence de comportement entre vésicules peut s'expliquer par le fait que la déformabilité varie d'une vésicule à l'autre et que la densité surfacique d'activateurs n'est pas parfaitement homogène sur l'ensemble des vésicules. Cette dispersion est observée en fluorescence : les variations d'intensité de fluorescence mesurée à la surface de vésicules N-WASP-Alexa488 issues du même gonflement sont de l'ordre de 30%. Comme le taux de couverture est faible comparé à celui des billes standard, le système est très sensible aux variations de densités. En outre, le fait que le mécanisme de branchement soit auto-catalytique amplifie les différences de comportement liées à une différence de densité d'activateurs.

### **5°) Il existe différents types de propulsion : régimes continu et saltatoire.**

Une fois la vésicule sortie de sa coque d'actine, elle est propulsée par polymérisation insertionnelle d'actine. J'ai observé qu'il existait deux types de mouvement clairement identifiables (Figure II-7):

- La vésicule peut être propulsée de manière continue, c'est à dire que sa vitesse est constante une fois sortie de la coque d'actine. Cela se traduit par une densité d'actine constante le long de la comète.
- La vésicule peut être propulsée de manière saltatoire, c'est à dire par sauts successifs. Cela se traduit par une succession de zones denses et de zones peu denses en actine qui correspondent respectivement à des phases de propulsion lente et rapide. Une fois la vésicule sortie de la coque initiale, elle parcourt une faible distance avant de s'arrêter et former un nouveau gel d'actine tout autour d'elle.



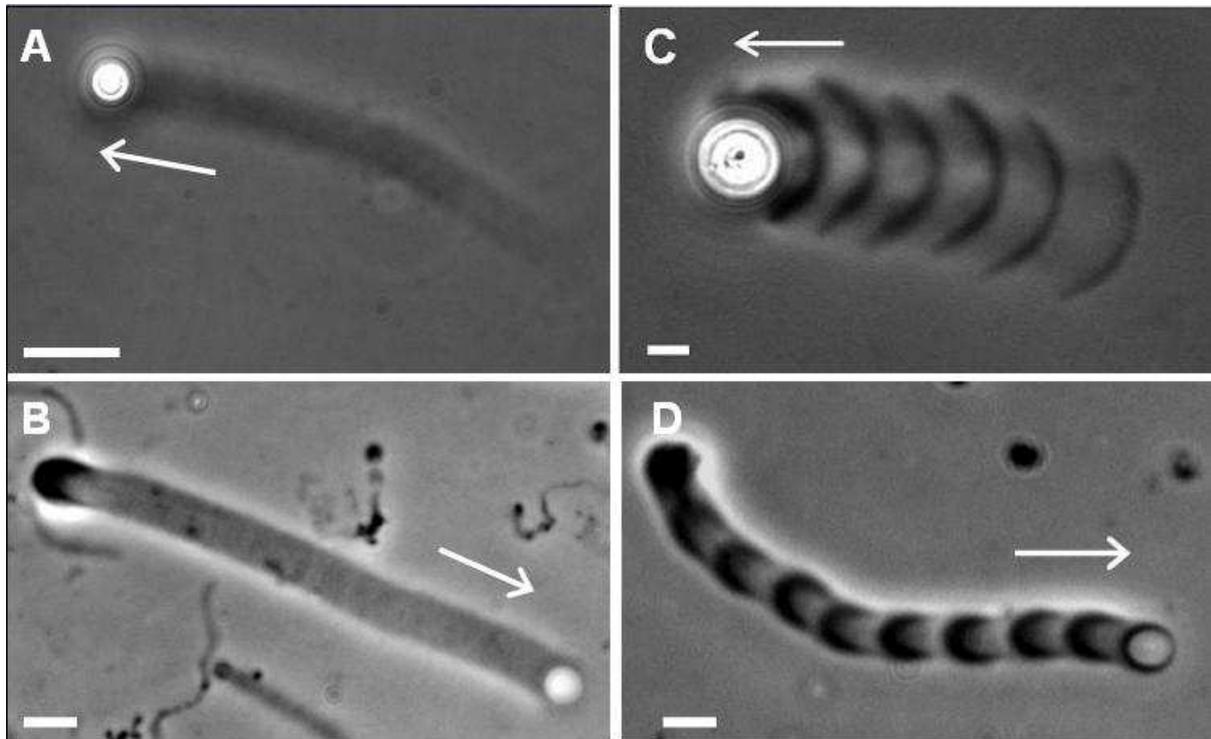
**Figure II-7: Les vésicules peuvent être propulsées de manière continue (vitesse constante) ou de manière saltatoire, c'est-à-dire par sauts successifs (vitesse oscillant entre des phases lentes et rapides de manière périodique). Les images en double fluorescence (lipides Rhodamine en rouge, et actine Alexa488 en vert) montrent une vésicule de 8,1 $\mu$ m de diamètre propulsée de façon continue (en haut) et d'une vésicule de 7,2 $\mu$ m de diamètre propulsée de façon saltatoire (en bas). Barres de calibration: 10 $\mu$ m**

Les sauts que nous observons sont beaucoup plus marqués que ceux décrits par Upadhyaya et collaborateurs pour des vésicules propulsées dans des extraits cellulaires (Upadhyaya et al. 2003). Dans cette étude, la vitesse est périodique et liée à des variations de déformation de la vésicule, le maximum de vitesse coïncidant avec le passage d'une forme allongée à une forme sphérique, de façon similaire à ce que nous observons. Néanmoins, les arrêts ne sont pas complets et les vésicules sont nettement moins déformées que dans notre cas. Soulignons également que les sauts sont micrométriques et facilement observables: ils sont donc différents de ce qui a pu être rapporté à l'échelle nanométrique pour *Listeria* (Kuo and McGrath 2000).

Un mouvement saltatoire avec des pas micrométriques a été observé chez le mutant ActA21-97 de *Listeria* par Lasa et collaborateurs (Lasa et al. 1997). Chaque période du mouvement se décompose en deux phases. Une phase lente qui coïncide avec une forte densité d'actine et une phase rapide accompagnée d'une densité plus faible. Ce type de mouvement a été reproduit avec des billes dans le milieu reconstitué (Bernheim-Groswasser et al. 2002). Le mouvement est lui aussi composé d'une succession de deux phases pour lesquelles une forte vitesse coïncide avec une faible densité du gel. Le mouvement saltatoire de billes est aussi marqué que celui des vésicules et la longueur des sauts est également micrométrique. Néanmoins, plusieurs éléments indiquent que le mécanisme à l'œuvre dans le cas des vésicules est différent.

Contrairement à ce qui a été rapporté pour les billes (Bernheim-Groswasser et al. 2002; Bernheim-Groswasser et al. 2005) nous observons le mouvement saltatoire indépendamment de la taille des vésicules (de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre). De plus, le mécanisme proposé pour expliquer le mouvement saltatoire des billes repose sur la nature de la friction à l'interface gel d'actine-bille (Bernheim-Groswasser et al. 2005), et ne semble pas s'appliquer à une surface fluide, comme celle d'une vésicule. Par ailleurs, des expériences récentes effectuées au laboratoire par Shashank Shekhar montrent que le comportement saltatoire des billes est favorisé par une faible épaisseur de l'échantillon (le gel d'actine interagit alors avec les parois, ce qui semble perturber son ouverture lors de l'expulsion de la bille) tandis que le mouvement saltatoire des vésicules est observé dans des échantillons dont l'épaisseur est un ordre de grandeur plus grand que leur diamètre (Delatour soumis à NJP). Enfin, la morphologie des comètes (Figure II-8) et le mode d'expulsion (Figure II-6) des vésicules diffèrent de ceux de billes.

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, le mouvement saltatoire des vésicules repose en effet sur un mécanisme qui leur est propre.



**Figure II-8 : Mouvement continu et mouvement saltatoire de billes et de vésicules.**

*Bille de polystyrène (A) et liposome géant (B), tous deux recouverts de N-WASP et propulsés par une comète d'actine en régime continu. Bille de 10 $\mu$ m (C) et liposome géant (D) en régime saltatoire observés en contraste de phase. Les régions sombres dans la comète d'actine correspondent à des zones denses en actine. Barres de calibration : 5 $\mu$ m.*



# **Chapitre III – Rôle de la mobilité des activateurs à la surface des vésicules**

Ce chapitre porte sur l'analyse du cas particulier du mouvement saltatoire et met en lumière le rôle majeur des propriétés de la surface, à savoir sa déformabilité et sa fluidité (qui permet la mobilité des activateurs à la surface). L'observation des vésicules a montré un mouvement particulier saltatoire, caractérisé par des comètes qui alternent des zones denses et peu denses en actine de manière périodique. Ce phénomène a également été observé avec des billes (Bernheim-Groswasser et al. 2002). Cependant, plusieurs éléments laissent supposer que le mécanisme à l'origine du mouvement saltatoire n'est pas le même chez les vésicules et les billes. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le rôle joué par la diffusion des activateurs et notamment sur l'équilibre entre diffusion et ségrégation avec comme objectif de comprendre quelle est l'origine du mouvement saltatoire.

## **I Conditions de prédominance du type de mouvement: saltatoire ou continu**

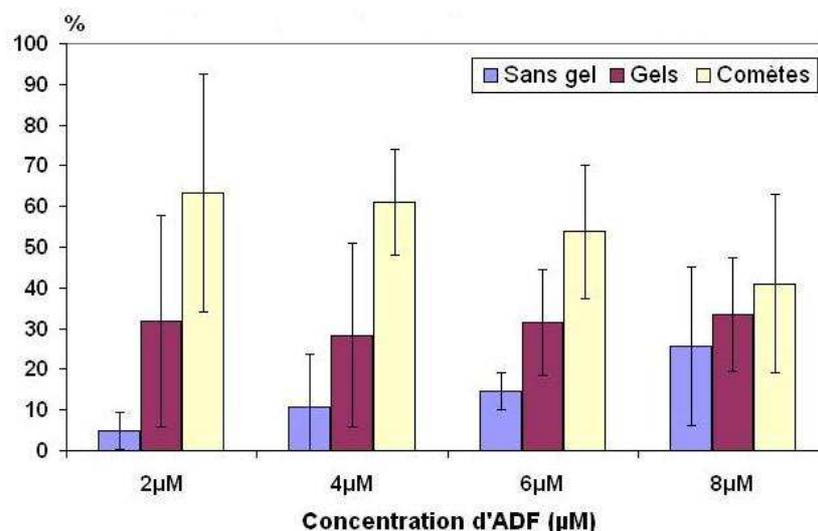
Après avoir observé que les vésicules peuvent être propulsées de manière continue ou saltatoire au sein d'un même échantillon, il apparaît important de comprendre ce qui détermine la nature du mouvement. Les expériences décrivant la propulsion saltatoire d'objets artificiels par polymérisation d'actine dans la littérature ont principalement été réalisées dans des extraits cellulaires qui contiennent de nombreuses protéines non identifiées et dont les concentrations ne sont pas connues (Upadhyaya et al. 2003; Trichet et al. 2007). Ce type d'approche ne permet pas de faire des études quantitatives du rôle des différents composants. En outre la concentration des protéines dans les extraits peut varier d'un extrait à l'autre. En revanche, le milieu de motilité minimum, biochimiquement contrôlé, permet de faire varier un grand nombre de paramètres, ce qui permet de déterminer l'influence individuelle de chacune des protéines.

Par ailleurs, les travaux de Bernheim-Groswasser et collaborateurs ont montré que la taille des billes jouait un grand rôle sur la fréquence d'apparition du mouvement saltatoire (Bernheim-Groswasser et al. 2002): les petites billes (diamètre  $< 2 \mu\text{m}$ ) sont propulsées en régime continu tandis que les billes de grande taille (diamètre  $> 4 \mu\text{m}$ ) sont propulsées de manière périodique.

Dans mes expériences, je n'ai pas constaté d'effet de la taille des vésicules sur la nature du mouvement : les vésicules saltatoires peuvent tout aussi bien être de petite que de grande taille. Dès lors, la première approche visant à comprendre l'origine du mouvement saltatoire consistait donc à faire varier les conditions biochimiques du milieu de motilité pour identifier les protéines impliquées dans la régulation du mode de propulsion. Comme nous l'avons vu précédemment, deux des protéines clés dans le milieu de motilité sont la gelsoline et le complexe Arp2/3. Elles se sont également avérées importantes dans la prédominance de l'un ou l'autre régime de propulsion.

### 1°) Effet de l'ADF

Dans un premier temps, j'ai fait varier la concentration d'ADF. On constate que plus la concentration d'ADF est grande, moins on observe de vésicules formant une comète et plus il y a de vésicules qui ne font pas de gel (Figure III-1). Ce résultat s'explique par le fait qu'une concentration trop élevée d'ADF induit une dépolymérisation de l'actine plus rapide que la formation du gel d'actine et/ou de la comète que la vésicule pourrait initier. On serait donc tenté de réduire la concentration d'ADF au minimum (2  $\mu$ M). Toutefois, il faut garder présent à l'esprit que l'ADF agit en synergie avec la profiline pour accélérer le treadmilling. Au final, j'ai choisi de travailler avec 4  $\mu$ M d'ADF dans le milieu de motilité : c'est une concentration plus faible que celle utilisée dans le milieu de motilité des billes (Wiesner et al. 2003), ce qui permet d'éviter la dépolymérisation des comètes et d'observer l'historique de propulsion.



**Figure III-1 : Effet de la concentration d'ADF sur la proportion de vésicules formant des comètes. Les vésicules sont classées en trois catégories : celles qui forment une comète (en ocre), celles qui s'entourent d'un gel mais ne brisent pas la symétrie et/ou ne forment pas de comète (en magenta) et celles qui ne forment ni gel, ni comète (en bleu).**

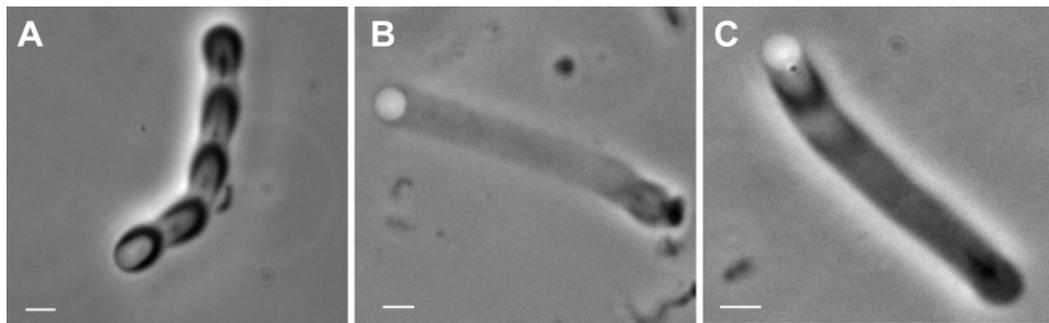
## 2°) Effet de l'Arp2/3 et de la gelsoline

Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'influence de la gelsoline et du complexe Arp2/3 sur le mouvement. La gelsoline diminue la taille des filaments mais augmente leur nombre, ce qui augmente le nombre total de bouts barbés. Néanmoins, seule une partie de ces bouts barbés restent libres (non coiffés) et peuvent s'allonger. Comme la gelsoline se fixe au bout barbé des filaments, elle inhibe également le branchement par Arp2/3. Les effets de la gelsoline et d'Arp2/3 sont donc intimement liés et il a été nécessaire de faire des gammes de concentration croisées, c'est à dire de faire varier la concentration d'Arp2/3 à différentes concentrations de gelsoline et vice-versa.

Dans les essais réalisés, les concentrations de gelsoline et d'Arp2/3 se sont effectivement révélées faire partie des paramètres critiques influant sur la fréquence d'apparition des mouvements saltatoire et continu. J'ai donc recherché les conditions biochimiques optimales au mouvement saltatoire. J'ai fait varier la concentration d'Arp2/3 de 0 à 250 nM à différentes concentrations de gelsoline (25, 50, 100, 150 et 250 nM), puis j'ai fait varier la concentration de gelsoline de 0 à 250 nM à différentes concentration d'Arp2/3 (10, 25, 50, 100, 175 et 250 nM). Les concentrations des autres protéines ont été maintenues constantes à 13,5  $\mu$ M d'actine, 2,4  $\mu$ M de profiline, et 4  $\mu$ M d'ADF.

Les vésicules ont été observées en contraste de phase en video-microscopie entre une et deux heures après avoir été placées dans le milieu de motilité. Elles ont été classées en trois catégories selon la morphologie de leur comète d'actine (Figure III-2):

- Mouvement saltatoire (Figure III-2A) : il s'agit de vésicules avec une comète présentant une alternance régulière de régions de faible et de forte densité en actine, dont la périodicité est suffisante pour déterminer avec précision un pas moyen (distance parcourue par la vésicule entre 2 sauts).
- Mouvement continu (Figure III-2B) : sont regroupées dans cette catégorie les vésicules dont la densité d'actine est homogène le long de la comète, sans surdensité locale d'actine.
- Mouvement intermédiaire (Figure III-2C) : cette catégorie regroupe toutes les autres vésicules, comme celles dont les comètes présentent des surdensités d'actine irrégulières, et/ou celles qui montrent une alternance entre les régimes saltatoire et continu. Ce type de mouvement pourrait être considéré comme saltatoire mais sa difficulté à se maintenir indique que la vésicule est dans un régime de propulsion proche du point de bascule entre continu et saltatoire.



**Figure III-2 : Le mouvement des vésicules est classé en trois catégories.**

**(A) Mouvement saltatoire : la période est constante et aisément mesurable.**

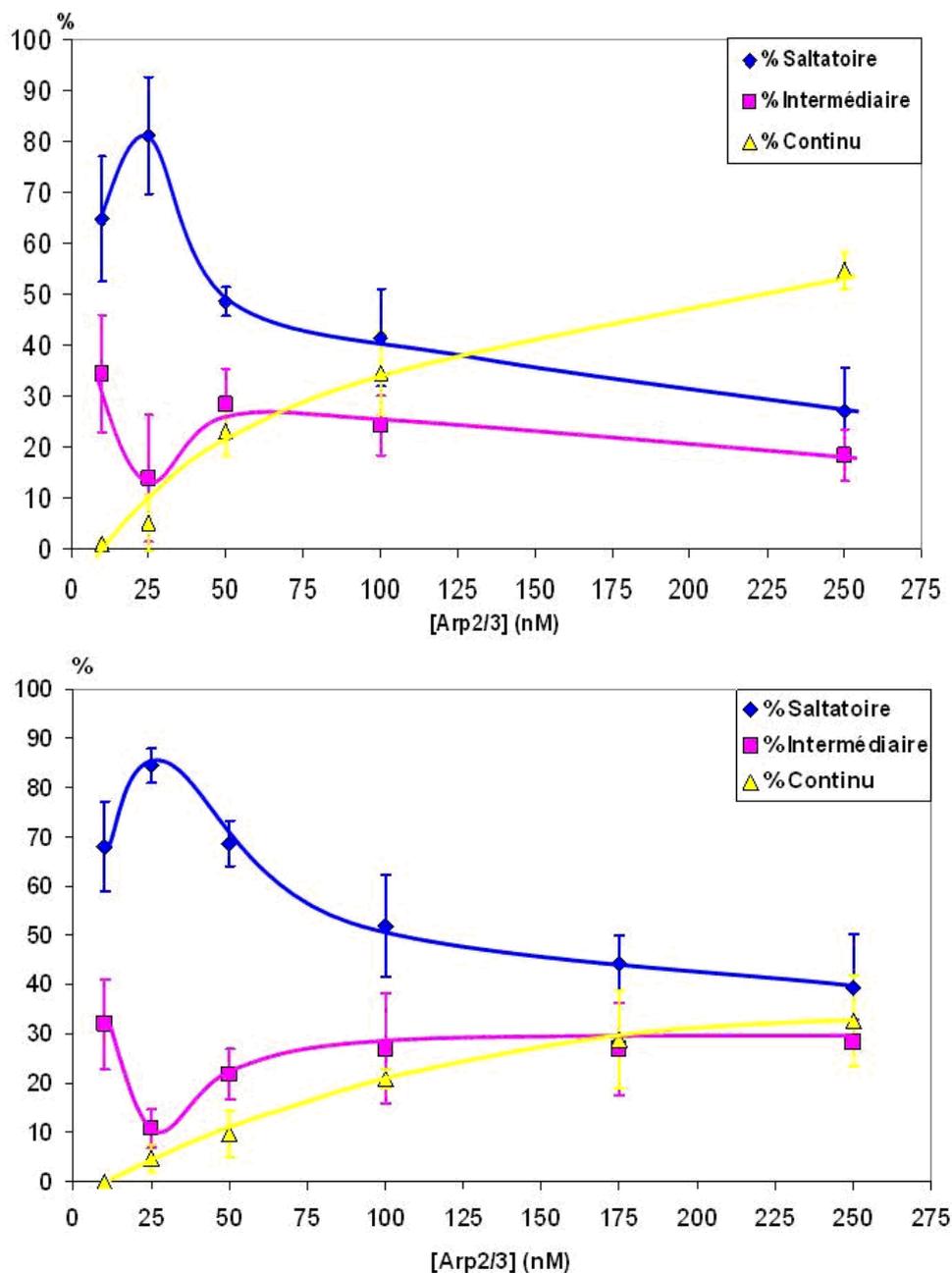
**(B) Mouvement continu : il n'y a pas de surdensités locales d'actine dans les comètes**

**(C) Mouvement intermédiaire : Les comètes présentent des surdensités irrégulières d'actine, ou des changements de régime. Barres de calibration : 10 µm.**

La première chose qui ressort de l'étude statistique des comètes est que la proportion de vésicules saltatoires est d'autant plus élevée que la concentration d'Arp2/3 est faible. Ce résultat est valable quelle que soit la concentration de gelsoline, même si on observe plus de mouvement saltatoire à 100 nM de gelsoline qu'à 50 nM (Figure III-3). Ceci est cohérent avec le fait que la gelsoline possède un effet inhibiteur sur le branchement en entrant en compétition avec le complexe Arp2/3 pour se fixer au bout barbé des filaments. La fréquence d'apparition du mouvement saltatoire étant forte lorsque l'activité de branchement est faible, il est logique qu'une inhibition du branchement par la gelsoline ait le même effet qu'une diminution de la concentration d'Arp2/3. Pour une même concentration d'Arp2/3, on observe donc davantage de mouvement saltatoire à 100 nM qu'à 50 nM de gelsoline.

Comme ~ 85% des vésicules sont saltatoires à 25 nM d'Arp2/3, on pourrait s'attendre à n'observer que le mouvement saltatoire à des concentrations encore plus faibles. Or la Figure III-3 montre une inflexion de la proportion de vésicules saltatoires au bénéfice du mouvement intermédiaire. Ce résultat s'explique par les critères de classification (arbitraires) retenus : les vésicules répertoriées dans la catégorie saltatoire doivent présenter une succession de zones de faible et de forte densité en actine suffisamment marquées pour permettre de déterminer la distance moyenne entre chaque saut avec une bonne précision. Or, en dessous de 25 nM d'Arp2/3, le mouvement est très lent et il est difficile d'identifier clairement chacun des sauts, c'est pourquoi le mouvement d'un grand nombre de vésicules a été répertorié dans la catégorie intermédiaire. On peut remarquer que si on place les mouvements clairement périodique et « intermédiaire » dans la même classe de mouvement « non continu », alors la courbe d'évolution du mouvement non continu devient une fonction monotone décroissante de la concentration d'Arp2/3.

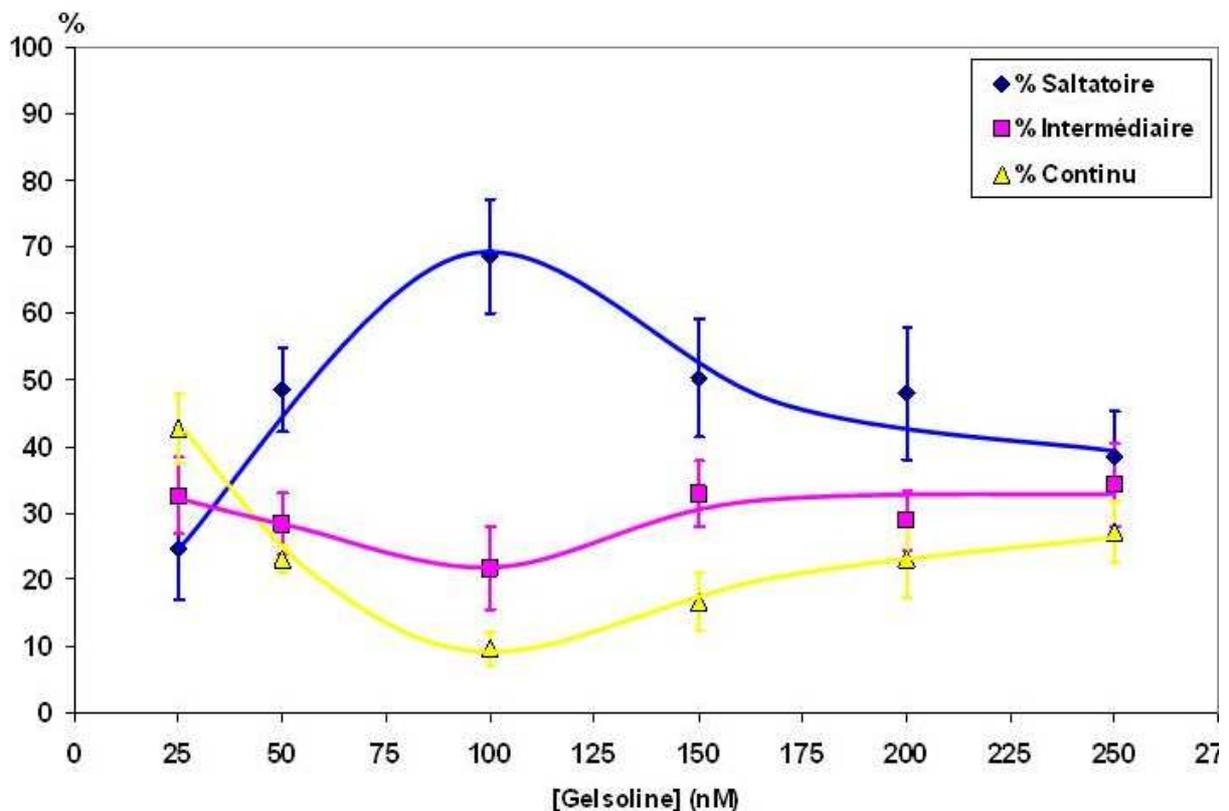
La proportion de mouvement intermédiaire est généralement de l'ordre de 20-30%, sauf à 25 nM d'Arp2/3 où on voit une inflexion de la courbe du mouvement intermédiaire. En effet, la prédominance du mouvement saltatoire est très nette dans ces conditions : il n'y a quasiment que du mouvement saltatoire, pas de mouvement continu ou intermédiaire. Lorsque la concentration d'Arp2/3 augmente, le mouvement continu devient de plus en plus important au détriment du mouvement saltatoire. En conclusion, la concentration d'arp2/3 optimale pour le mouvement saltatoire semble être de l'ordre de 25-50 nM.



**Figure III-3: Influence de la concentration d'Arp2/3 sur la fréquence d'apparition des mouvements saltatoire (en bleue), continu (en jaune) ou intermédiaire (en rose) en présence de 50 nM (en haut) et 100 nM (en bas) gelsoline.**

Comme nous l'avons vu, les effets de la gelsoline et du complexe Arp2/3 sont intimement liés. Pour déterminer les conditions les plus favorables au mouvement saltatoire, il faut donc également déterminer la concentration de gelsoline. Nous observons qu'il existe également une concentration optimale de gelsoline pour le mouvement saltatoire, même si l'effet est moins prononcé que pour le complexe Arp2/3. Aux faibles concentrations de gelsoline, on observe une légère prédominance du mouvement continu. La fréquence du mouvement continu diminue au bénéfice du mouvement saltatoire lorsque la concentration en gelsoline augmente. Le pic de mouvement saltatoire est atteint pour une concentration de gelsoline de l'ordre de 100 nM. Au-delà, on observe une diminution de la proportion de vésicules en régime saltatoire et une augmentation de la proportion de vésicules en régime continu (figure III-4)

On observe de nouveau que si on place les mouvements clairement périodique et « intermédiaire » dans la même classe de mouvement non continu, la courbe obtenue montre une augmentation de la proportion de mouvement non continu avec la concentration de gelsoline jusqu'à un plateau atteint à environ 100 nM de gelsoline.



**Figure III-4 : Influence de la concentration de gelsoline sur la fréquence d'apparition des mouvements saltatoire (courbe bleue), continu (en jaune) ou intermédiaire (en rose) en présence de 50 nM Arp2/3.**

Ces résultats sont difficiles à interpréter car la gelsoline possède plusieurs effets :

- En se fixant au bout barbé des filaments, la gelsoline entre en compétition avec le complexe Arp2/3 et inhibe le branchement, ce qui favorise le mouvement saltatoire.
- Bien que la gelsoline abolisse la croissance au bout barbé des filaments, elle accélère la croissance des filaments non coiffés en établissant une concentration stationnaire plus élevée d'actine-G dans le milieu.
- Les données montrent qu'en présence de 50 nM Arp2/3, des concentrations assez faibles de gelsoline privilégient le mouvement continu, en accord avec les travaux de Carlsson selon lesquels le mouvement résulte d'un équilibre entre formation de nouveaux filaments par branchement et arrêt de la croissance par coiffage des filaments. En augmentant la concentration de gelsoline, il se peut que la nucléation soit réprimée, et qu'ainsi il soit difficile de former le réseau branché cohésif qui engendre la propulsion. Cette situation favoriserait le mouvement saltatoire.

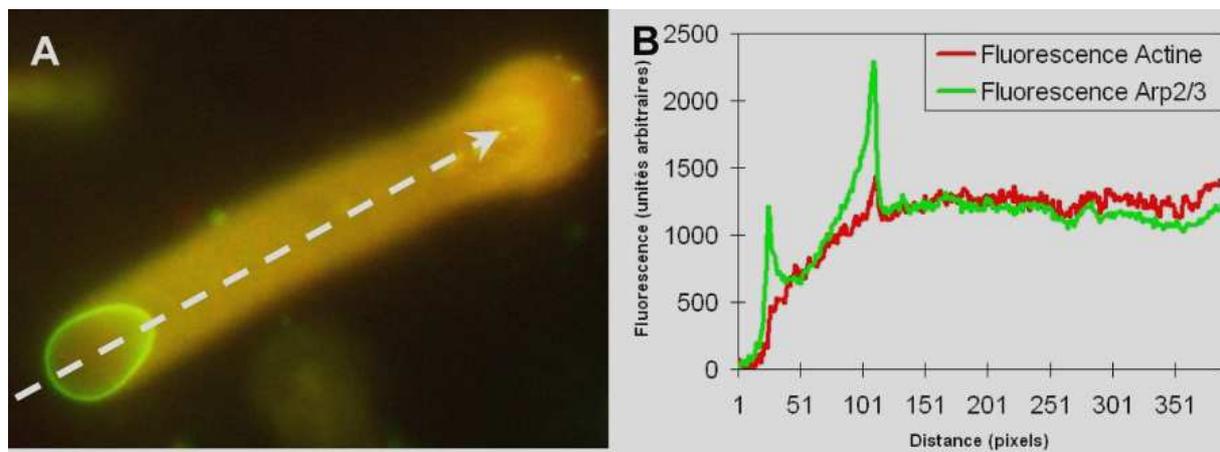
En conclusion, les conditions biochimiques optimales pour le mouvement saltatoire sont 50 nM Arp2/3 et 100 nM gelsoline. Ces résultats suggèrent que l'établissement d'un mouvement continu requiert un taux de branchement minimum. Bien que les conditions biochimiques favorables au mouvement saltatoire soient désormais connues et donnent des indices pour comprendre l'origine du mouvement saltatoire, d'autres informations sont requises pour comprendre comment s'établit soit le mouvement continu soit le mouvement saltatoire.

## **II Caractéristiques mésoscopiques du mouvement saltatoire**

### **1°) Structure de la comète de vésicules saltatoire : densité de branchement**

Le mouvement saltatoire est caractérisé par une succession de zones de faible et de forte densité en actine qui correspondent à des phases de mouvement respectivement lent et rapide.

Pour déterminer si les différentes phases (denses et peu denses en actine) du mouvement saltatoire sont caractérisées par des densités de branchement différentes, j'ai mesuré la fluorescence de l'actine marquée à la rhodamine et de l'Arp2/3 marqué à l'Alexa 488 le long des comètes d'actine. Le rapport des intensités de fluorescence Arp2/3:actine représente la quantité d'Arp2/3 par actine, c'est-à-dire la densité de branchement. Il faut noter qu'il s'agit d'une valeur relative et non d'une valeur absolue. J'ai d'abord vérifié que, comme dans le cas des billes (Wiesner et al. 2003), la densité de branchement dans les comètes de vésicules en mouvement continu est constante (Figure III-5).

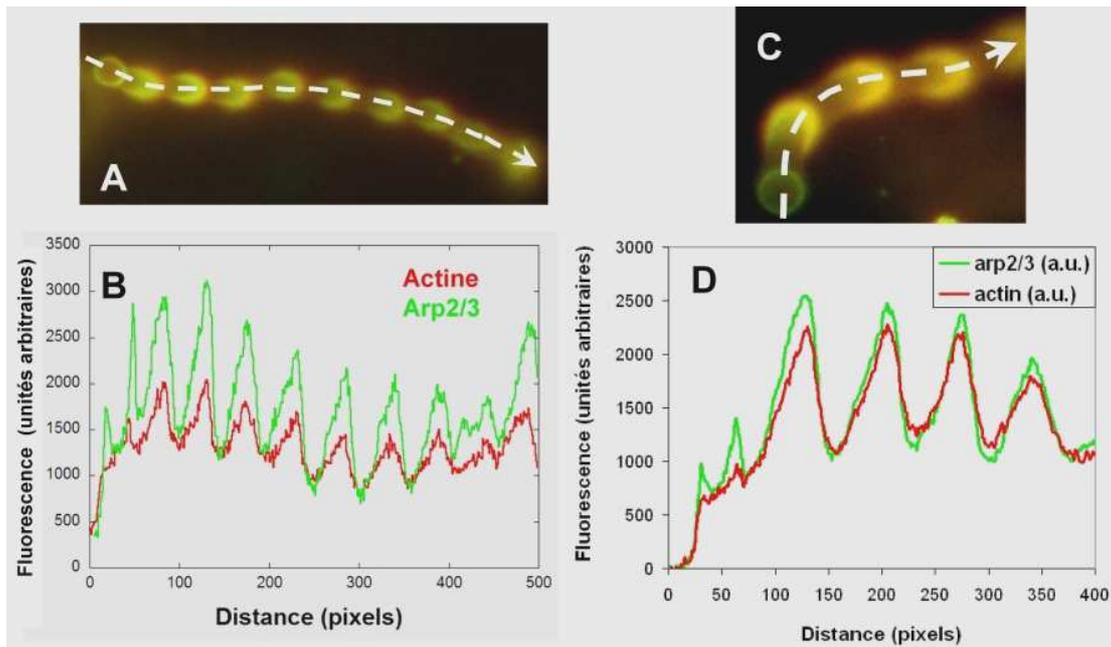


**Figure III-5 : Mesure de la densité de branchement le long de la comète d'actine d'une vésicule de 12,3 µm en régime continu.**

*A: Image en double-fluorescence de la vésicule : actine-rhodamine (en rouge) et N-WASP-Alexa 488 (en vert). B: Intensité de fluorescence d'Arp2/3 (en vert) et de l'actine (en rouge) le long de la ligne de scan tracée en A.*

Dans le cas du mouvement saltatoire, nous avons observé que les surdensités d'actine dans les comètes étaient corrélées avec des surdensités d'Arp2/3. Cependant, la densité de branchement mesurée n'était pas systématiquement plus élevée dans les zones denses que dans les zones moins denses (de 0% à 30% maximum).

En effet, nous avons observé des vésicules pour lesquelles le rapport des signaux de fluorescence d'Arp2/3 et d'actine était constant le long de la comète (Figure III-6 A, B), et d'autres vésicules pour lesquelles il oscillait le long de la comète, avec des valeurs plus fortes dans les zones denses (Figure III-6 C,D). Cependant les variations sont très modestes (moins de 30 %)



**Figure III-6 : Mesure de la densité de branchement le long de la comète d'actine de vésicules en mouvement saltatoire.**

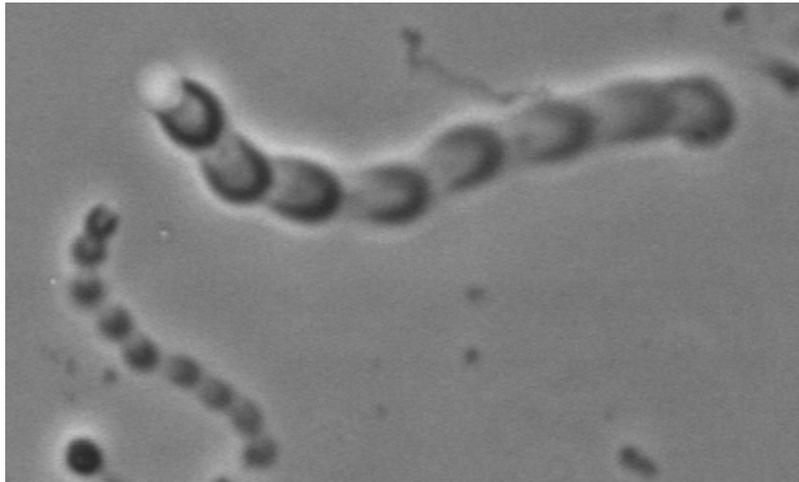
*A, C : Images en double-fluorescence Arp2/3 Alexa488 (en vert) + Actine Rhodamine (en rouge) d'une vésicule de 12,3  $\mu\text{m}$  (A) et d'une vésicule de 4  $\mu\text{m}$  (C)*

*B, D : Intensité de fluorescence de l'actine (en rouge) et de l'Arp2/3 (en vert). Dans le cas de la vésicule de droite, les signaux se superposent, i.e. la densité de branchement est constante le long de la comète. A gauche, la vésicule montre une surdensité de branchement dans les zones denses en actine et en Arp2/3.*

En conclusion, on ne peut pas affirmer que des variations de densité de branchement importantes soient impliquées dans le phénomène de mouvement saltatoire, ni que la densité de branchement donne des informations pertinentes sur la structure de la comète d'actine permettant de différencier les vésicules en mouvement continu ou saltatoire.

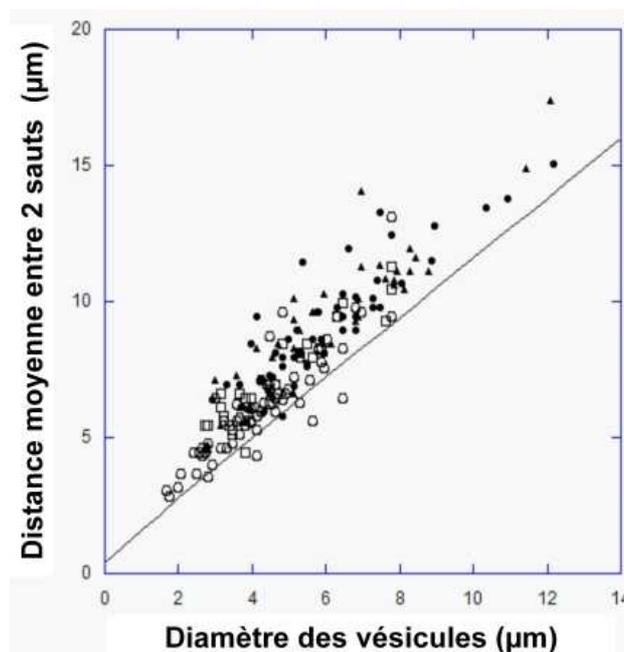
## **2°) Le pas de la comète dépend du diamètre de la vésicule.**

J'ai voulu comprendre si l'analyse de paramètres physiques du mouvement saltatoire (période, pas moyen en relation avec la taille des vésicules ...) était susceptible d'être responsable de l'apparition de ce type de mouvement. Le mouvement saltatoire est remarquable par sa capacité à répéter un grand nombre de fois le «même» saut: on peut observer plusieurs dizaines de sauts sans que la périodicité spatiale ou temporelle soit affectée. La grande reproductibilité du saut nous a permis de calculer le pas moyen dans les comètes en divisant la longueur  $l$  de la comète par le nombre  $n$  de sauts où  $n$  est un nombre entier. La taille des vésicules n'influe pas sur l'occurrence du mouvement saltatoire mais elle affecte le pas du mouvement : les vésicules effectuent des sauts d'autant plus grands que leur diamètre est grand (Figure III-7).



**Figure III-7 : Image de deux vésicules saltatoires (3 et 9  $\mu\text{m}$  de diamètre) en contraste de phase. La distance parcourue par les vésicules au cours d'un saut dépend de leur diamètre : les vésicules de grand diamètre font des sauts plus grands que les petites.**

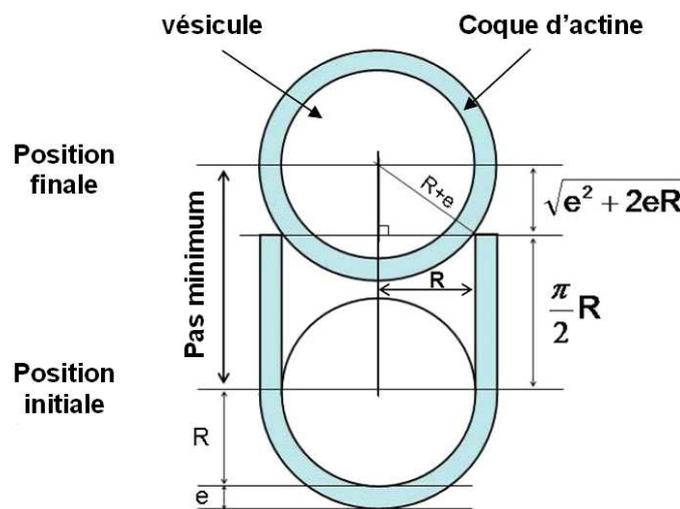
L'étude statistique du pas moyen en fonction du diamètre des vésicules a montré que le pas moyen est légèrement supérieur au diamètre de la vésicule: les vésicules font des sauts d'une longueur environ 1,1 fois égale à leur diamètre, quelle que soit la composition biochimique du milieu (Figure III-8).



**Figure III-8: La distance entre deux sauts augmente quasi-linéairement avec le diamètre des vésicules quelles que soient les conditions biochimiques du milieu de motilité.**

*Chaque point correspond à une vésicule. Les mesures ont été réalisées à différentes concentrations de gelsoline et d'Arp2/3 : 25 nM Arp2/3 + 50 nM gelsoline (triangles), 25 nM Arp2/3 + 100 nM gelsoline (carrés), 100 nM Arp2/3 + 50 nM gelsoline (ronds noirs), et 250 nM Arp2/3 + 100 nM (ronds blancs). Les mesures ont été réalisées sur plusieurs centaines de vésicules mais une seule partie des données est représentée par souci de clarté. La courbe en pointillés correspond à un pas minimum théorique (voir ci-dessous).*

A partir de considérations géométriques simples, nous avons défini un pas minimum (Figure III-9) comme la plus petite distance susceptible d'être parcourue par le centre de masse de la vésicule entre l'expulsion de la vésicule depuis sa position initiale et l'apparition d'un nouvel gel d'actine d'épaisseur  $e$  à la surface de la vésicule (avant l'ouverture du nouveau gel). Le gel d'actine croît jusqu'à atteindre une épaisseur critique  $e$  avant que la vésicule ne soit expulsée. Cette épaisseur reste constante d'un saut à l'autre pour une vésicule donnée. Les mesures de  $e$  sur différentes vésicules ont donné la relation suivante :  $e = 0.087 \times D + 0.38$ , où  $D$  est le diamètre de la vésicule l'ouverture de la coque d'actine. Le pas minimum résultant vaut  $\sqrt{eD + e^2} + \frac{\pi}{4} D$ . Il varie quasi-linéairement avec le diamètre de la vésicule.



**Figure III-9 : Calcul géométrique d'un pas minimum théorique.**

La distance parcourue par la vésicule au delà du pas minimum varie d'une vésicule à l'autre. Ceci peut être dû d'une part à la déformabilité de la vésicule : la vésicule a tendance à s'allonger, ce qui se traduit également par un allongement du gel d'actine, donc une augmentation du pas observé. De plus, la vésicule continue à avancer sur une faible distance une fois sortie du gel d'actine. Ces deux faits ne sont pas pris en compte dans le calcul du pas minimum théorique.

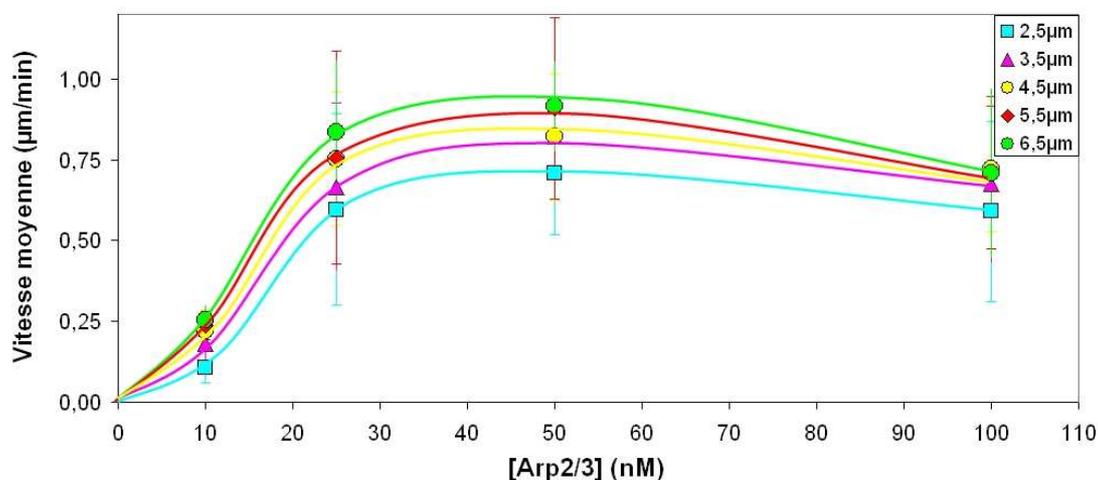
Il est remarquable que le pas moyen dépend de la taille des vésicules mais pas des conditions biochimiques du milieu de motilité. Les concentrations de gelsoline et d'Arp2/3 influent sur la balance entre mouvement saltatoire et mouvement continu, mais on n'observe pas d'évolution graduelle de la taille du pas avec les concentrations de ces deux protéines, ni de passage d'un mouvement saltatoire à un mouvement continu par augmentation du pas par exemple. Au contraire, quelles que soient les conditions biochimiques, toute vésicule en mouvement saltatoire montre un pas moyen en accord avec les données de la Figure III-8.

### **3°) Vitesse moyenne et période en fonction de la concentration d'Arp2/3.**

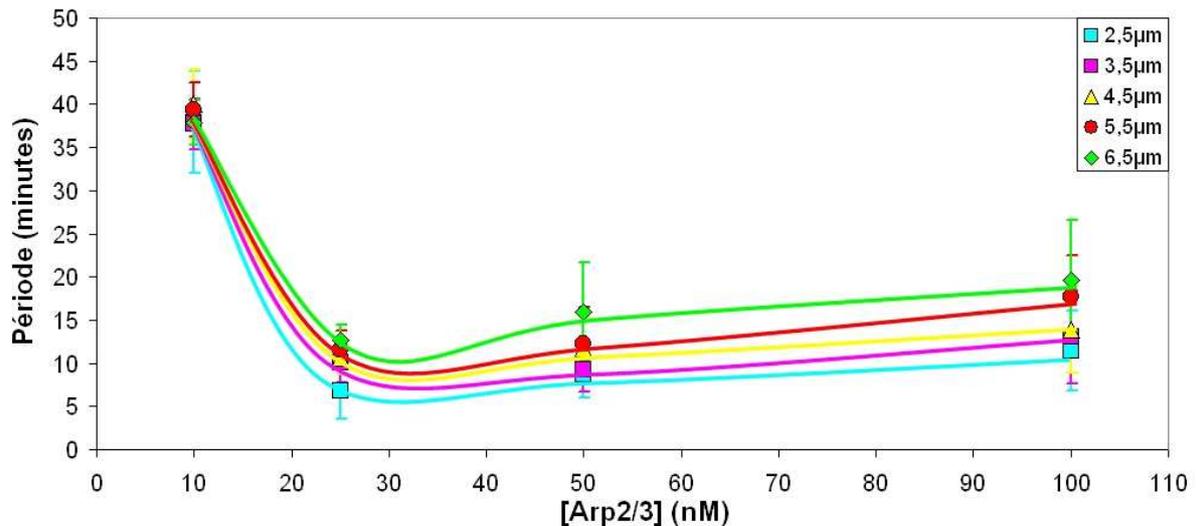
Jusqu'à présent, notre description du mouvement saltatoire a été uniquement statique car nous avons analysé la succession de zones de faible et de forte densité en actine à un instant donné. Une approche cinétique (période du mouvement) est nécessaire. Aux concentrations d'Arp2/3 faibles mais suffisantes pour obtenir un mouvement saltatoire net ( $\approx 25$  nM), le mouvement est plus lent que pour des concentrations d'Arp2/3 plus élevées. La concentration d'Arp2/3 pourrait affecter la période (temps entre deux sauts), à défaut du pas.

C'est effectivement ce que nous avons observé en mesurant la vitesse de propulsion et la période en fonction de la concentration d'Arp2/3 (Figures III-10 et III-11) :

- Aux faibles concentrations d'Arp2/3 (10 nM), le temps mis par une vésicule saltatoire pour effectuer un cycle (saut complet) est très élevé (de l'ordre de 40 minutes) et la vitesse moyenne est très faible (environ  $0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Il est raisonnable de penser que la faible activité de branchement engendre un faible nombre de filaments participant à la propulsion.
- Lorsque la concentration d'Arp2/3 augmente, la vitesse moyenne des vésicules augmente (environ  $0,7 \mu\text{m}/\text{min}$  à 25 nM Arp2/3) et le temps entre 2 sauts est réduit (environ 10 min)
- La vitesse cesse de croître lorsque la concentration d'Arp2/3 augmente au delà de 50 nM. L'effet négatif dû à l'attachement des filaments à la vésicule lors du branchement l'emporte sur l'effet positif des filaments non attachés qui participent au mouvement.
- Cette étude portant sur la vitesse de vésicules saltatoires, il a été difficile de recueillir des données au delà de 100 nM d'Arp2/3 car le mouvement continu devenait prédominant.



**Figure III-10 : Vitesse moyenne de vésicules saltatoires en fonction de la concentration d'Arp2/3 pour différentes tailles de vésicules. Les lignes sont des guides pour les yeux.**



**Figure III-11 : Période du mouvement de vésicules saltatoires en fonction de la concentration d'Arp2/3 pour différentes tailles de vésicules. Les lignes sont des guides pour les yeux.**

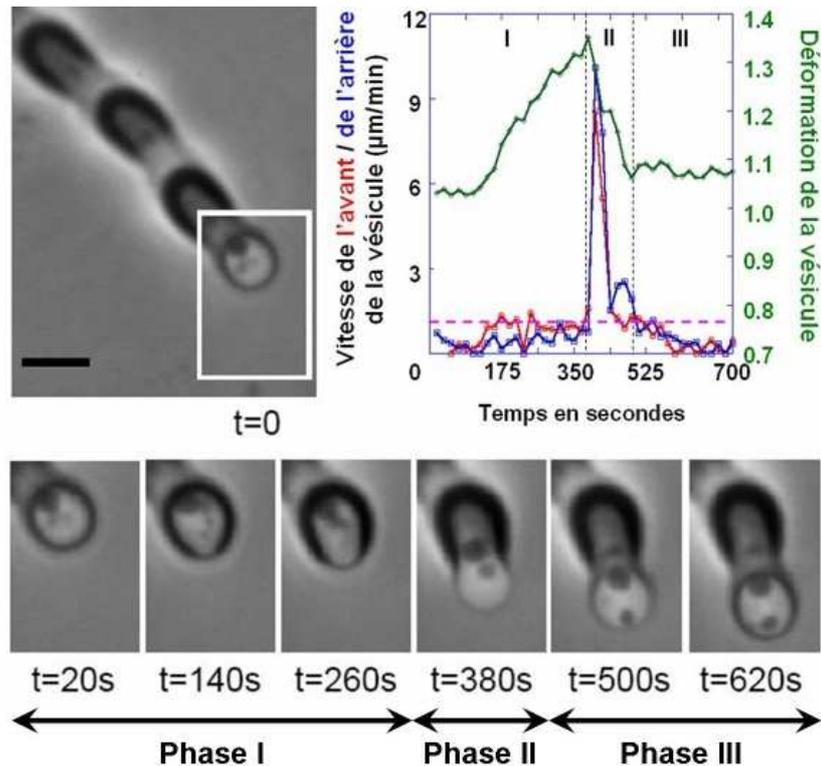
### **III Analyse dynamique du mouvement saltatoire**

Un saut dans le mouvement saltatoire est en fait la répétition du premier saut lors de l'initiation du mouvement décrite dans le Chapitre II (croissance d'un gel symétrique, brisure de symétrie et expulsion). Pour comprendre l'origine du mouvement saltatoire, nous avons analysé les caractéristiques d'un saut et les avons comparées à celles du mouvement continu.

#### **1°) Analyse fine de la vitesse et de la déformation des vésicules au cours d'un saut.**

En suivant à haute résolution spatiale et temporelle des vésicules en microscopie à contraste de phase, nous avons vu qu'un saut peut être décomposé en trois grandes phases.

Un gel d'actine commence par croître de manière homogène autour de la vésicule. Il s'amincit lentement en un point, jusqu'à former un pore à travers lequel la vésicule s'allonge progressivement (Phase I). Lorsque l'arrière de la vésicule se détache du gel d'actine, elle est expulsée brutalement de la coque d'actine : l'expulsion est caractérisée par un pic de vitesse qui atteint ici 10 μm/min. Ce mouvement rapide résulte de la conversion de l'énergie emmagasinée dans la déformation de la vésicule au cours de la phase I. Lorsque la vésicule est sortie de la coque d'actine, elle ralentit graduellement jusqu'à s'arrêter complètement et retrouve une forme quasi sphérique avant de recommencer un nouveau cycle (Figure III-12).



**Figure III-12: Analyse de la déformation et de la vitesse d'une vésicule au cours d'un saut.**

L'image (en haut à gauche) et la série d'images (en bas) sont des images séquentielles en contraste de phase prises au cours d'un saut d'une vésicule de  $8,1 \mu\text{m}$  de diamètre. Le pas du mouvement est de  $13 \mu\text{m}$  et la période est de 680 secondes, ce qui correspond à une vitesse moyenne de  $1,14 \mu\text{m}/\text{min}$ . Le temps  $t = 0$  correspond au début d'un cycle, c'est-à-dire quand la vésicule est arrêtée et commence à s'entourer d'un nouveau gel d'actine. Barre de calibration =  $10 \mu\text{m}$ . Le graphique montre les vitesses de l'avant (en rouge) et de l'arrière (en bleu) de la vésicule au cours du cycle, ainsi que sa déformation (en vert) égale à son grand axe divisé par son diamètre au repos. Les lignes verticales délimitent les 3 phases du mouvement. La ligne horizontale en pointillés roses correspond à la vitesse de vésicules continues de même taille :  $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ .

Il est intéressant de constater que le pic de déformation intervient juste avant le pic de vitesse. En effet, le pic de vitesse correspond à la relaxation de l'énergie emmagasinée dans la déformation de la vésicule, ce qui explique que la vésicule ait déjà commencé à reprendre sa forme sphérique au moment où le pic de vitesse se produit.

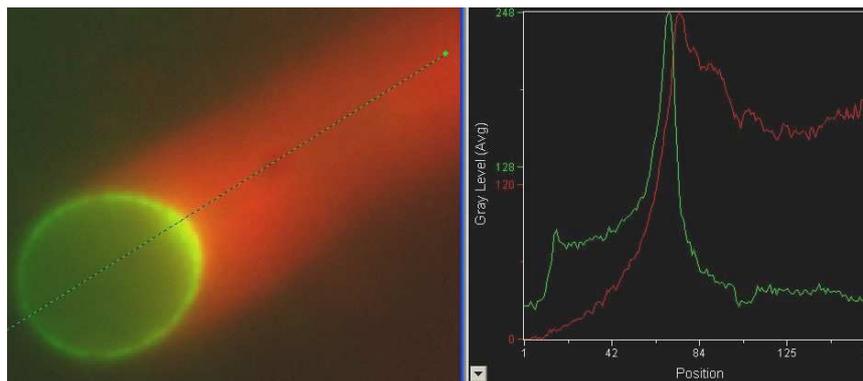
A la fin de la phase III, la vésicule ne reprend pas toujours une forme parfaitement sphérique avant de recommencer un cycle. Le nouveau gel d'actine peut donc être légèrement asymétrique. Par ailleurs, comme l'arrière de la vésicule est connecté à la comète d'actine formée lors de la (courte) phase de propulsion, le nouveau gel d'actine a tendance à se former préférentiellement à l'arrière de la vésicule, ce qui prédispose la vésicule à être expulsée toujours dans la même direction. Il en résulte un mouvement dirigé sans changement de direction marqué.

Lorsque la vésicule est expulsée violemment et qu'elle retrouve une forme complètement sphérique, il arrive que la brisure de symétrie à l'origine du saut suivant ne soit pas corrélée à l'orientation du saut précédent. On observe alors un mouvement présentant une directionnalité moins clairement établie.

La vitesse de vésicules en mouvement continu, de même taille que celle montrée ci-dessus, est de  $1,1 \mu\text{m}/\text{min}$ , valeur proche de la vitesse de la vésicule à la fin de la phase II (Figure III-12). Le mouvement continu peut donc être vu comme une situation où la vitesse de la vésicule en fin de phase II serait prolongée indéfiniment. Les vésicules en mouvement saltatoire, au contraire, ralentissent jusqu'à s'arrêter pendant la phase III et recommencent alors un nouveau cycle.

## **2°) Répartition des activateurs à la surface des vésicules pendant les mouvements continu et saltatoire.**

Afin de comprendre quel mécanisme moléculaire engendre un mouvement saltatoire ou un mouvement continu, nous avons étudié la distribution des activateurs à sa surface au cours du temps. Pour cela, j'ai marqué N-WASP à l'Alexa 488. Dans le cas du mouvement continu, les molécules de N-WASP sont plus concentrées à l'arrière des vésicules : la Figure III-13 montre une vésicule propulsée en régime continu et suivie en double-fluorescence d'actine-rhodamine (rouge) et de N-WASP-Alexa 488 (vert). La surdensité de N-WASP à l'arrière de la vésicule est clairement visible :

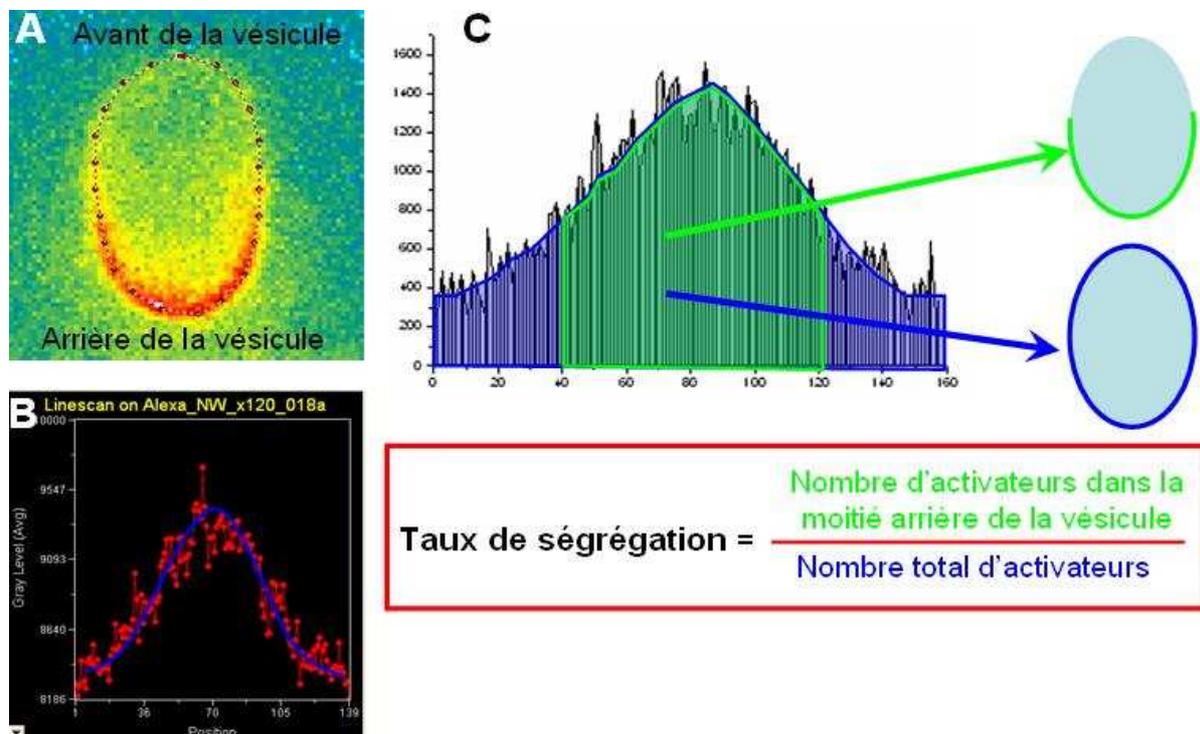


**Figure III-13: Visualisation de l'actine et de N-WASP sur une vésicule de  $6,2 \mu\text{m}$  en régime continu: on observe une nette surdensité de N-WASP à l'arrière de la vésicule.**

*A gauche : Image en double fluorescence de l'actine-rhodamine (en rouge) et du N-WASP-Alexa 488 (en vert). A droite : Profils des intensités de fluorescence de l'actine (en rouge) et du N-WASP (en vert) le long de la ligne de scan sur l'axe de la comète.*

*Les fluorescences respectives sont mesurées le long d'une ligne de scan dessinée suivant l'axe de la comète, les pics du profil vert correspondent aux faces avant et arrière de la vésicule, et le pic arrière est environ trois fois plus intense que le pic avant.*

Afin de quantifier la ségrégation des activateurs à la surface des vésicules, nous avons défini un taux de ségrégation comme le rapport entre la fluorescence des activateurs présents sur la moitié arrière de la vésicule et la fluorescence totale des activateurs présents sur toute sa surface. Le taux de ségrégation est calculé comme décrit dans la Figure III-14 : une ligne de scan est tracée le long du contour de la vésicule imagée en fluorescence d'Alexa 488 (A) ; l'intensité du signal de fluorescence est mesurée le long de la ligne (B) ; on divise l'intégrale sous la partie médiane de la courbe, en vert, par l'intégrale sous toute la courbe, en bleu (C). Le taux de ségrégation peut donc varier entre 0,5 et 1 : La valeur 0.5 correspond à une répartition uniforme des activateurs sur la vésicule ; la valeur 1 correspond au cas où tous les activateurs se trouvent sur la moitié arrière de la vésicule.



**Figure III-14 : Calcul du taux de ségrégation de N-WASP à la surface d'une vésicule.**

*A : Image en fluorescence d'Alexa-488 du N-WASP autour d'une vésicule (en fausses couleurs). Le contour de la vésicule est tracé à la main sous Metamorph 6.1.*

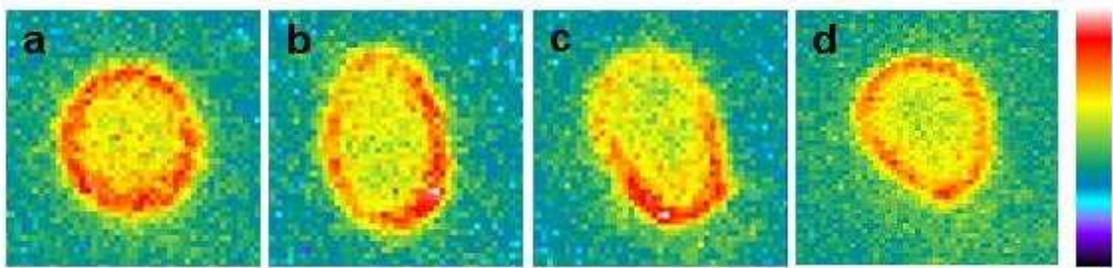
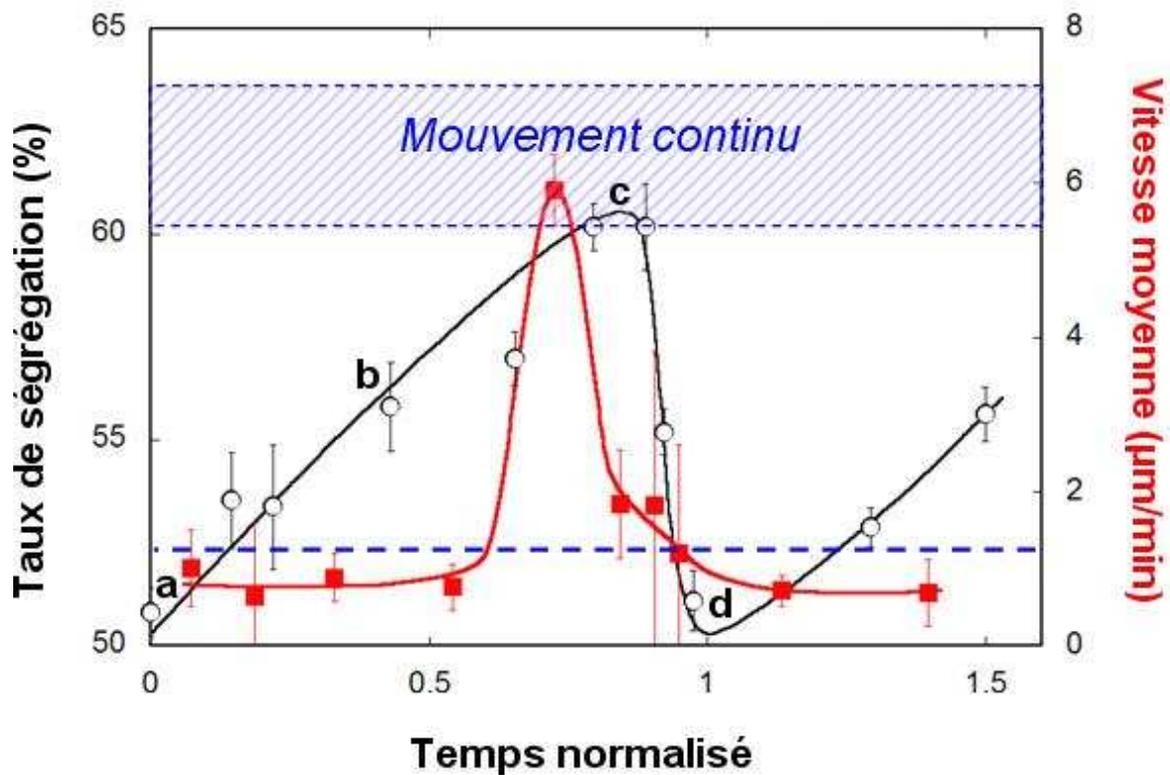
*B : Profil d'intensité de fluorescence le long du contour de la vésicule. L'abscisse 0 correspond au centre de la partie avant de la vésicule, où l'intensité est minimale. Le maximum d'intensité correspond au centre de la partie arrière de la vésicule. L'abscisse maximale correspond au périmètre P de la vésicule.*

*C : Le profil est analysé avec Origin 5.0 pour calculer le rapport entre l'intégrale sous la courbe entre l'abscisse P/4 et 3P/4 et l'intégrale sous la courbe entière. Ce ratio correspond au rapport de la fluorescence des activateurs de la moitié arrière de la vésicule par la fluorescence de la totalité des activateurs présents à la surface de la vésicule.*

Au cours du mouvement continu, le taux de ségrégation est constant et de l'ordre de  $0,63 \pm 0,05$  : il y a environ deux fois plus d'activateurs à l'arrière de la vésicule qu'à l'avant. En revanche, pendant le mouvement saltatoire, le taux de ségrégation varie au cours d'un saut (Figure III-15) :

- Au début de la phase I du cycle, c'est-à-dire lorsque la vésicule à l'arrêt commence tout juste à s'entourer d'un gel d'actine, les activateurs sont répartis de manière homogène autour de la vésicule. Le taux de ségrégation est de 0,5 tant que le gel d'actine reste symétrique.
- Lorsque la symétrie de révolution est brisée, on constate qu'à l'endroit où le gel s'ouvre, la densité d'actine diminue progressivement, tout comme la densité de N-WASP. Au fur et à mesure que le pore s'ouvre et que la vésicule s'allonge, la densité de N-WASP diminue à l'avant de la vésicule, ce qui se traduit par une augmentation du taux de ségrégation.
- Lorsque l'arrière de la vésicule se détache du gel d'actine (Phase II), la vésicule est brusquement propulsée vers l'avant et le taux de ségrégation atteint une valeur maximale d'environ 0,6 qui correspond à la fourchette basse des valeurs mesurées dans le cas du mouvement continu.
- Lors de la phase III, la vitesse de la vésicule diminue rapidement jusqu'à s'arrêter et pendant ce temps, le taux de ségrégation chute pour revenir à son niveau initial de 0,5 au début de la phase I.

Un nouveau gel d'actine commence alors à croître autour de la vésicule et un nouveau cycle recommence. Comme nous l'avons déjà vu, la vésicule ne reprend pas toujours une forme parfaitement sphérique à la fin de la phase III avant qu'un nouveau gel d'actine recommence à croître autour de la vésicule. L'analyse de la distribution du N-WASP Alexa488 révèle que le taux de ségrégation ne revient pas strictement à 0,50 : les activateurs restent légèrement polarisés à la fin du cycle. Ceci explique pourquoi le nouveau gel d'actine commence à se former préférentiellement à l'arrière de la vésicule, prédisposant ainsi la vésicule à être expulsée toujours dans la même direction. Bien que ce cas de figure soit assez rare en pratique, on peut observer que lorsque la distribution des activateurs redevient rigoureusement homogène en fin de cycle, la direction de l'expulsion suivante est beaucoup plus aléatoire et on peut observer des changements de direction plus marqués.

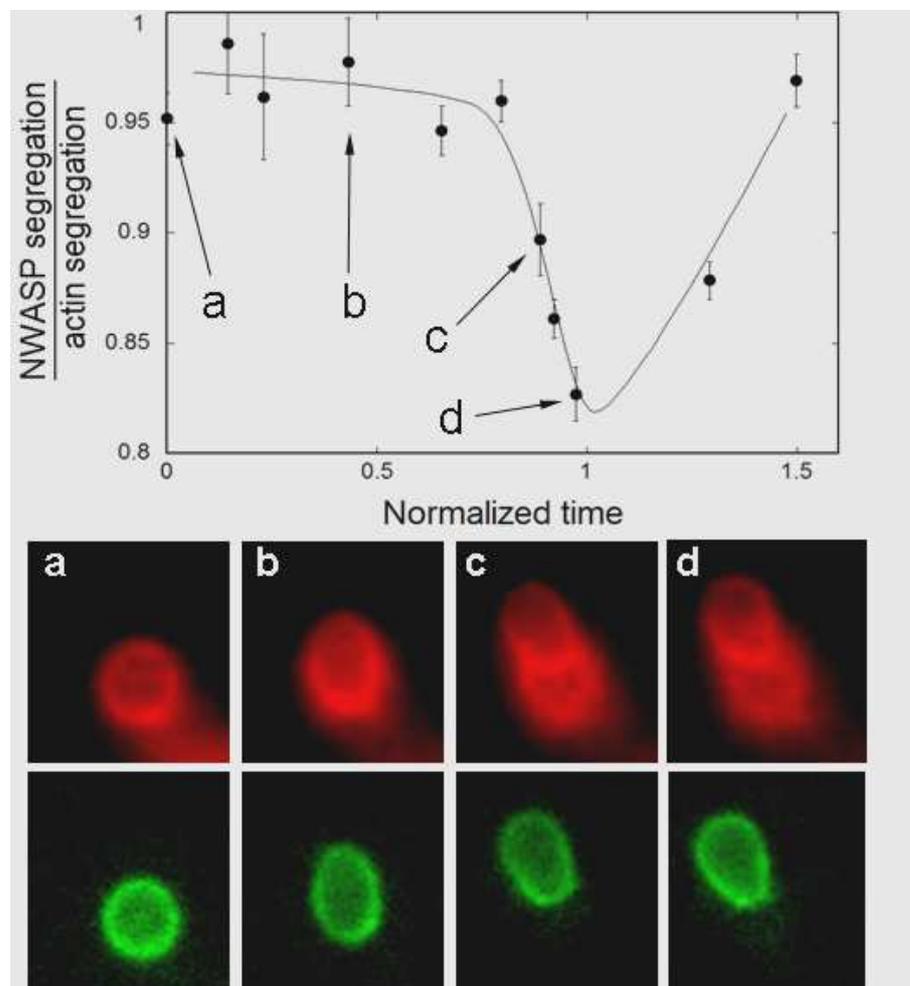


**Figure III-15 : Evolution du taux de ségrégation de N-WASP-Alexa 488 à la surface d’une vésicule de 3,3  $\mu\text{m}$  et de sa vitesse instantanée au cours d’un cycle du mouvement saltatoire, en comparaison avec le mouvement continu.**

La courbe noire représente le taux de ségrégation de N-WASP au cours d’un cycle du mouvement saltatoire. Chaque point correspond à la moyenne des mesures effectuées 6 fois sur la même image ; les barres d’erreur correspondent à l’erreur standard. La courbe rouge représente la vitesse instantanée de la vésicule. Le temps est normalisé par rapport à la période (de l’initiation d’un gel d’actine par la vésicule à l’arrêt jusqu’au retour au même état après le saut). La bande hachurée bleue correspond à la gamme de valeurs des taux de ségrégation mesurés pour 7 vésicules continues dans les mêmes conditions biochimiques (100 nM gelsoline et 50 nM Arp2/3) ; leur vitesse moyenne est représentée par la droite horizontale bleue en pointillés. Les images en bas montrent la fluorescence du N-WASP aux différents temps (a à d) notés sur le graphique. Les fausses couleurs traduisent une intensité de fluorescence croissante du bleu au rouge.

Ces résultats mettent en lumière une différence fondamentale entre le mouvement continu et le mouvement saltatoire : les vésicules continues maintiennent un taux de ségrégation élevé et constant tandis que, chez les vésicules saltatoires, la ségrégation des activateurs diminue après l’expulsion.

Afin de comprendre comment les molécules de N-WASP ségrégent à l'arrière de la vésicule, nous avons suivi simultanément la ségrégation du N-WASP et de l'actine au cours d'un cycle saltatoire. L'évolution du rapport des deux taux de ségrégation indique le degré de co-ségrégation des deux protéines. La Figure III-16 montre que ce rapport reste constant autour de 0,97 lors de la phase I (brisure de symétrie), ce qui indique que la distribution des activateurs et des filaments d'actine est identique, même lors de la brisure de symétrie (le gel d'actine et les activateurs se polarisent simultanément). Lorsque la vésicule est expulsée du gel d'actine (phase II), le rapport des taux de ségrégation diminue, ce qui signifie que les activateurs se redistribuent de manière homogène avant les filaments d'actine. Au cours de la phase III, le rapport des taux de ségrégation revient alors à son niveau initial, ce qui signifie que l'actine à son tour se répartit de façon homogène.



**Figure III-16: La liaison N-WASP – filaments d'actine est transitoire.**

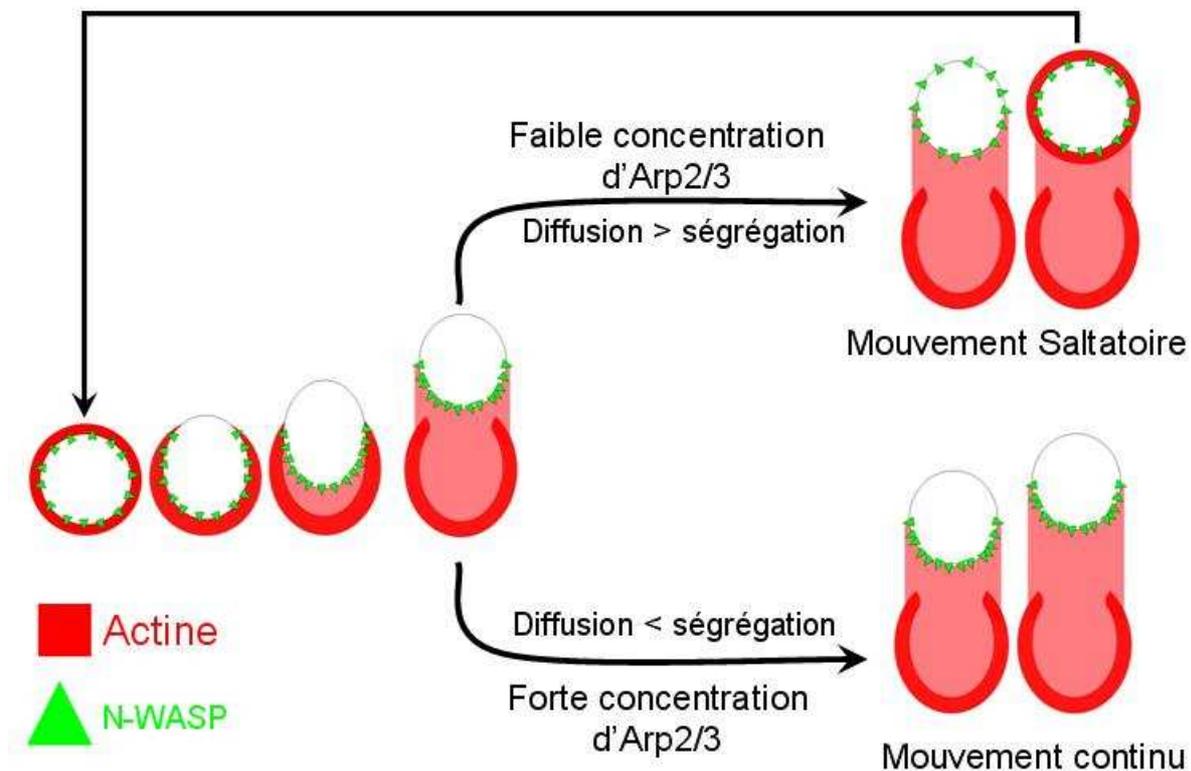
*En haut* : le graphique représente l'évolution du rapport entre les taux de ségrégation des activateurs et de l'actine varie au cours d'un cycle saltatoire. La ligne en pointillés représente le taux de ségrégation des vésicules en mouvement continu.

*En bas* : images en double fluorescence de l'actine-rhodamine (en rouge) et du N-WASP-Alexa 488 (en vert) à différents moments caractéristiques d'un saut.

Cette mesure permet de conclure que l'interaction entre les filaments d'actine et le complexe N-WASP est transitoire. Lors de l'expulsion, cette liaison est rompue, ce qui permet aux activateurs de diffuser à la surface des vésicules et de reprendre une répartition homogène, et de générer ensuite un nouveau gel d'actine, homogène lui aussi.

Ces résultats permettent de comprendre pourquoi de fortes concentrations d'Arp2/3 favorisent le mouvement continu : le complexe Arp2/3 peut être vu comme un adaptateur qui assure la liaison entre N-WASP et les filaments d'actine (Figure III-17). Lorsque la concentration d'Arp2/3 est élevée, il existe un grand nombre de connexions entre le gel d'actine et les activateurs sur la vésicule. La présence d'un réseau cohésif de filaments limite la diffusion des molécules de N-WASP à la surface de la membrane. Ceci assure le maintien de la ségrégation des activateurs et permet l'établissement d'un mouvement continu stationnaire. En revanche, aux faibles concentrations d'Arp2/3, les connexions entre la vésicule et le gel d'actine sont peu nombreuses, ce qui permet aux sites N-WASP non liés aux filaments d'actine de diffuser plus longtemps et de se redistribuer à la surface : il y a alors perte de la ségrégation des activateurs. Ce phénomène peut avoir deux conséquences négatives sur le mouvement :

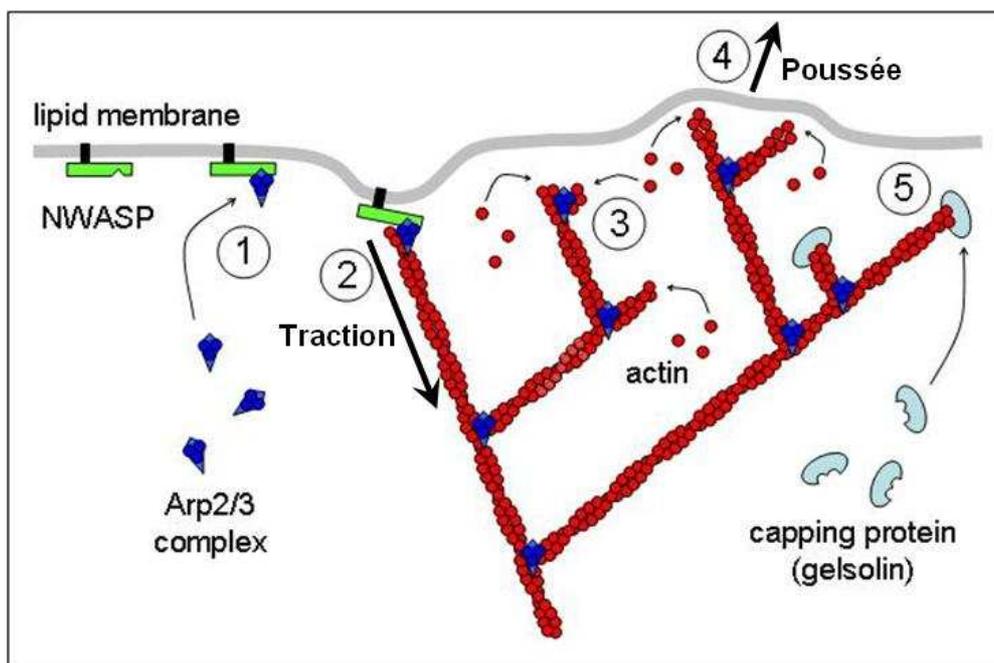
- ❖ L'appauvrissement en sites N-WASP à l'arrière de la vésicule fait que le nombre de filaments devient insuffisant pour permettre à la propulsion de se poursuivre. Il est en effet raisonnable de penser qu'il faut un nombre minimal de filaments en élongation, non liés à la membrane, pour maintenir la propulsion.
- ❖ Le retour d'une quantité importante d'activateurs à l'avant de la vésicule permet la croissance de nouveaux filaments à l'avant, ce qui se traduit au final par la croissance d'un nouveau gel d'actine homogène autour de la vésicule.



**Figure III-17 : Représentation schématique de la distribution de N-WASP (triangles verts) à la surface de la vésicule au cours de son expulsion du gel d'actine (en rouge) et au cours du mouvement qui s'en suit, selon qu'il soit continu ou saltatoire.**

Par ailleurs, il semble clair que l'expulsion de la vésicule est un événement brutal au cours duquel de fortes contraintes mécaniques s'exercent sur la liaison N-WASP-Arp2/3-filament, et que la tension peut être suffisante pour rompre cette liaison. Cependant, ce phénomène ne saurait expliquer seul le mouvement saltatoire: si la rupture mécanique des liens entre la vésicule et la comète d'actine était seule responsable de l'arrêt de la vésicule, on devrait observer une diffusion extrêmement rapide du N-WASP et un arrêt de la vésicule immédiatement après l'expulsion. Or, on constate que la vésicule continue d'être propulsée pendant plusieurs minutes : pendant ce temps, la ségrégation est perdue progressivement en  $\sim 100$  sec, comme en témoigne la décélération progressive de la vésicule au cours de la phase III. Il n'y a donc pas de rupture totale entre la vésicule et le gel d'actine. En conclusion, la prédominance de l'un ou l'autre des deux types de mouvement dépend essentiellement de la balance entre diffusion et ségrégation des activateurs, qui est médiée par Arp2/3.

Nous proposons dans la Figure III-18 un modèle moléculaire de génération de force basé sur la compétition entre la ségrégation et la diffusion du N-WASP à la surface de la vésicule. Les sites N-WASP libres, ou venant de se dissocier du complexe Arp2/3 après une réaction de branchement, peuvent diffuser à la surface de la membrane. Au contraire, les sites N-WASP liés à Arp2/3 interagissent avec les filaments par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 et sont solidaires du gel d'actine, donc leur diffusion est restreinte. Tout comme il existe deux populations d'activateurs, on peut distinguer deux populations de filaments : les filaments liés à la membrane par l'intermédiaire du complexe N-WASP-Arp2/3 et les filaments libres. Les filaments libres s'allongent et participent à la force propulsive tandis que les filaments liés à N-WASP-Arp2/3 sont connectés à la membrane et retiennent la vésicule vers l'arrière et gênent le mouvement. Nos résultats sont en accord avec le modèle d'attachement détachement prévu en 1999 par Gerbal et collaborateurs et repris en 2003 dans le modèle de *tethered ratchet* (Mogilner and Oster 2003).



**Figure III-18: Représentation schématique du mécanisme moléculaire de propulsion par polymérisation insertionnelle d'actine: ségrégation-diffusion et modèle du tether ratchet.**

1) N-WASP, qui est attaché à la membrane lipidique, fixe et active le complexe Arp2/3. 2) Le complexe Arp2/3 recrute le bout barbé d'un filament d'actine, qui est alors attaché à la membrane. 3) Une fois dissocié de N-WASP, le complexe Arp2/3 initie la formation d'une branche latérale. 4) Les branches mère et fille des filaments libres s'allongent et poussent contre la membrane. 5) L'extrémité barbée des filaments en élancement finit par être coiffée par la gelsoline, ce qui bloque l'élancement ultérieure des filaments, qui dépolymérisent progressivement. Le milieu de motilité contient également de l'ADF qui dépolymérise les filaments depuis leur extrémité pointue et de la profiline, qui accélère l'élancement des filaments à leur extrémité barbée.

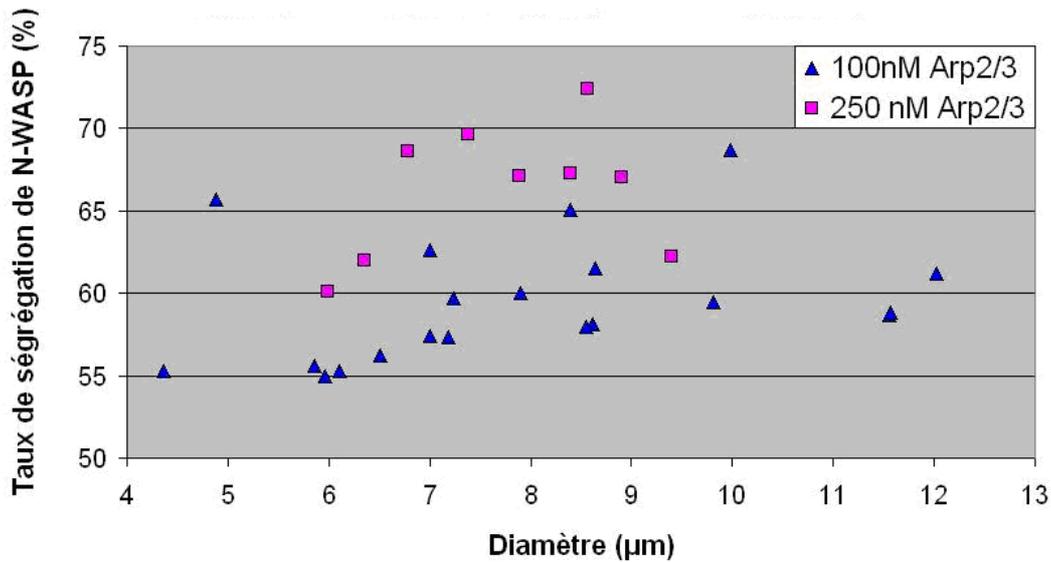
# **Chapitre IV : Analyse du mécanisme d'interaction activateur - filament**

Nous avons vu dans le chapitre précédent l'importance de la mobilité des activateurs à la surface des vésicules. Nos différentes expériences sur le mouvement saltatoire nous ont amenés à proposer un modèle de ségrégation-diffusion du N-WASP médié par Arp2/3, qui assure un lien transitoire entre l'activateur et le filament. Ce schéma nous permet d'expliquer l'effet de la concentration d'Arp2/3 sur la bifurcation entre les deux régimes. Cependant, nos résultats ne prouvent pas que le mécanisme est nécessairement le même dans le cas du mouvement continu. Le récent travail de Co et al. a en effet montré que N-WASP seul suffisait à assurer le lien avec les filaments d'actine (Co et al. 2007).

Ce chapitre porte sur des expériences complémentaires visant à analyser plus finement le mécanisme d'interaction entre la membrane et le gel d'actine. Nous démontrons qu'Arp2/3 détermine la ségrégation de N-WASP à la surface des vésicules, et qu'en affectant la liaison entre N-WASP et Arp2/3, nous altérons la comète d'actine et le mouvement.

## **I Arp2/3 contrôle le taux de ségrégation de N-WASP**

J'ai mesuré la ségrégation de N-WASP sur des vésicules de taille variable en mouvement continu, en fonction de la concentration d'Arp2/3 (Figure IV-1). Pour une taille de vésicule donnée, le taux de ségrégation augmente avec la concentration d'Arp2/3. Par ailleurs, pour une concentration donnée d'Arp2/3, il augmente très sensiblement avec la taille des vésicules. Ces résultats confortent le modèle de ségrégation – diffusion et d'attachement des filaments à N-WASP par l'intermédiaire du complexe Arp2/3.



**Figure IV-1 : Taux de ségrégation de N-WASP en fonction de la taille des vésicules à 100 nM (triangles bleus) et 250 nM (carrés roses) d'Arp2/3. La ségrégation augmente avec la taille de vésicules, et elle est plus importante à forte concentration d'Arp2/3.**

Le fait que le taux de ségrégation augmente légèrement avec la taille des vésicules est assez intuitif : plus la vésicule est grande, plus la ségrégation sera difficile à perdre. La ségrégation des activateurs conduit à la formation d'un réseau cohésif de filaments qui est riche en bouts barbés. Après détachement du complexe Arp2/3-filament d'actine, les sites N-WASP libérés ont plus de chance de rencontrer un autre Arp2/3 et d'être fixés à un nouveau filament avant d'avoir pu diffuser jusqu'à l'avant de la vésicule. Ce résultat est cohérent avec le travail de Trichet et collaborateurs sur des gouttelettes d'huile recouvertes d'activateurs d'Arp2/3 (Trichet et al. 2007). Ces auteurs montrent que la fréquence d'apparition du mouvement saltatoire diminue quand la taille des gouttelettes augmente, ce qui suggère qu'elles maintiennent plus facilement la ségrégation des activateurs que celles de petite taille. Cependant, je n'ai pas observé d'effet de la taille sur la nature du mouvement de vésicules lipidiques recouvertes de N-WASP, dans les conditions utilisées. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les activateurs ne soient pas les mêmes ou par une différence de densité d'activateur dans les deux systèmes : on peut s'attendre à ce qu'un objet ayant une faible densité d'activateurs soit plus sensible à l'effet de la taille.

De manière analogue on comprend que le taux de ségrégation augmente avec la concentration d'Arp2/3 : plus la concentration d'Arp2/3 est élevée, plus il existe de connexions entre les filaments d'actine et les molécules de N-WASP à la surface des vésicules. Ceci multiplie les chances pour un activateur libre de fixer un filament d'actine et favorise le maintien de la ségrégation.

## **II Arp2/3 est ségrégué au cours du mouvement**

Comme pour N-WASP, nous avons mesuré le taux de ségrégation d'Arp2/3-Alexa 488 à la surface de vésicules continues (100 nM Arp2/3 et 100 nM gelsoline). A la différence de N-WASP, Arp 2/3 est présent non seulement à la surface des vésicules (lorsqu'il est lié à N-WASP) mais également aux jonctions branchées des filaments qui sont formées dans la zone de mesure (correspondant à une distance maximum de ...nm dans l'épaisseur de la comète). La fluorescence mesurée le long du contour des vésicules correspond donc à la somme de la fluorescence de l'Arp2/3 lié à N-WASP à la surface des vésicules et de la fluorescence de l'Arp2/3 lié aux filaments dans la zone de ...nm de début de la comète. Pour observer l'Arp2/3 uniquement lié à N-WASP, il faut donc soustraire la contribution de la fluorescence d'Arp2/3 issue de la comète.

Pour cela, on peut soustraire un signal de fluorescence moyen d'Arp2/3, estimé dans la comète, au signal mesuré sur la vésicule. Toutefois, cette méthode n'est pas rigoureuse si la densité d'Arp2/3 n'est pas tout à fait constante le long de la comète. Une deuxième approche consiste à utiliser le fait que la densité de branchement est constante le long des comètes des vésicules continues (cf Chapitre III). Après avoir mesuré le rapport Arp2/3:actine par double-fluorescence le long de la comète, nous utilisons cette valeur constante pour calculer la contribution d'Arp2/3 due au gel d'actine autour de la vésicule. En soustrayant ce signal à la fluorescence totale d'Arp2/3 mesurée autour de la vésicule, on obtient l'intensité de la fluorescence correspondant uniquement à l'Arp2/3 lié aux vésicules.

Les deux approches ont donné des résultats cohérents : le taux de ségrégation d'Arp2/3 lié aux vésicules est compris entre 0,66 et 0,84. Ces valeurs sont toujours plus élevées que celles mesurées pour la ségrégation de N-WASP dans les mêmes conditions (0,60) : Arp2/3 est plus ségrégué que N-WASP à la surface des vésicules. Ce résultat suggère que la sous-population de sites N-WASP connectés à Arp2/3 est plus ségréguée que celle correspondant à l'intégralité des sites N-WASP. Ce résultat indique clairement qu'Arp2/3 est à l'origine de la ségrégation.

### **III Vésicules fonctionnalisées avec des fragments de N-WASP**

Comme décrit dans l'introduction, N-WASP comporte un domaine catalytique VCA qui active constitutivement le complexe Arp2/3. Afin de conforter le modèle proposé, j'ai réalisé des expériences complémentaires avec des fragments de N-WASP dont différents domaines ont été tronqués dans le but de modifier son interaction avec Arp2/3. J'ai comparé le mouvement de vésicules fonctionnalisées avec les protéines suivantes :

- ❖ N-WASP complet: le comportement des vésicules N-WASP étant très bien caractérisé, ce contrôle sert de témoin de routine.
- ❖ VCA : Il s'agit d'un fragment de 117 acides aminés de N-WASP correspondant à sa partie C-terminale constitutivement active. Elle se compose de deux domaines WH2 qui lient un monomère ou un filament d'actine, d'un domaine central C qui lie Arp2/3 et enfin d'une partie acide A qui stabilise l'interaction avec le complexe Arp2/3.
- ❖ VC : Il s'agit des résidus 392 à 484 de N-WASP, sans le domaine A. On s'attend à ce que l'activation du branchement à la surface des vésicules soit altérée.
- ❖ V : Il s'agit des résidus 392 à 458 de N-WASP dont les parties acide et centrale ont été tronquées. Ce fragment correspond donc aux deux domaines WH2 de N-WASP et ne devrait pas être en mesure d'initier des filaments branchés par Arp2/3.

Pouvoir tester l'activité de VC adsorbé sur une surface présente un avantage par rapport aux cinétiques de polymérisation d'actine-pyrène en solution. En solution, VC fixe l'actine G par le domaine WH2, comme le fait VCA, mais à la différence de VCA, la fixation de Arp2/3 est trop faible pour induire le branchement des filaments, et on n'observe que l'inhibition de la polymérisation de l'actine par VC. A cause de ce biais, on ne peut pas se baser sur l'analyse de cinétiques de polymérisation pour étudier les propriétés de branchement de ce fragment.

En revanche, si VC est adsorbé à la surface des vésicules, il peut séquestrer une proportion importante d'actine en solution. La concentration d'actine G reste donc inaltérée. Même si les événements de fixation d'Arp2/3 sont rares, ils peuvent donner lieu à un branchement observable. En outre, les deux situations en solution (suivi des cinétiques de polymérisation de l'actine en solution par fluorimétrie) et sur une surface (initiation et recrutement des filaments d'actine par des activateurs ancrés à la surface) sont différentes. Dans le premier cas, les molécules peuvent diffuser latéralement et rotationnellement et on mesure des vitesses de réaction globales. Dans le deuxième cas, des contraintes géométriques et stériques peuvent imposer l'orientation des molécules à la surface et affecter les réactions.

## **1°) Les vésicules N-WASP et VCA ont un comportement semblable.**

Le comportement des vésicules VCA est similaire à celui des vésicules N-WASP. En solution, N-WASP est dans une conformation inactive et nécessite d'être activé pour exposer son domaine VCA à Arp2/3 et induire le branchement des filaments. Lors des premiers essais de fonctionnalisation, nous avons vérifié qu'il était immobilisé dans sa conformation active à la surface des vésicules, comme dans le cas des billes : l'addition de Cdc42 chargé en GTP $\gamma$ S au milieu de motilité n'améliore pas le mouvement des vésicules. Il est donc logique de ne pas observer de différence marquée entre les vésicules fonctionnalisées avec VCA ou N-WASP. Toutefois, il existe des différences entre les deux systèmes :

1) Les vésicules VCA mettent plus de temps à s'entourer d'un gel d'actine. Après fonctionnalisation dans les mêmes conditions (250 nM d'activateur), les vésicules VCA génèrent un gel d'actine en ~ 30 min au lieu d'une dizaine de minutes pour les vésicules N-WASP. Ceci est peut-être dû à la présence du VCA resté en solution qui entre en compétition avec le VCA fixé aux vésicules. La présence possible de N-WASP en solution ne pose pas le même problème puisqu'il est inactif.

2) VCA étant beaucoup plus petit que N-WASP, la densité surfacique des vésicules VCA est susceptible d'être plus élevée que celle des vésicules N-WASP. Cela se traduit par la formation d'un gel plus réticulé dans le cas de VCA et une augmentation du temps mis par les vésicules pour sortir de la coque d'actine. Cet effet est toutefois très modéré et globalement, les vésicules N-WASP et VCA se comportent de manière très semblable.

## **2°) Les vésicules V ne génèrent pas de gel d'actine.**

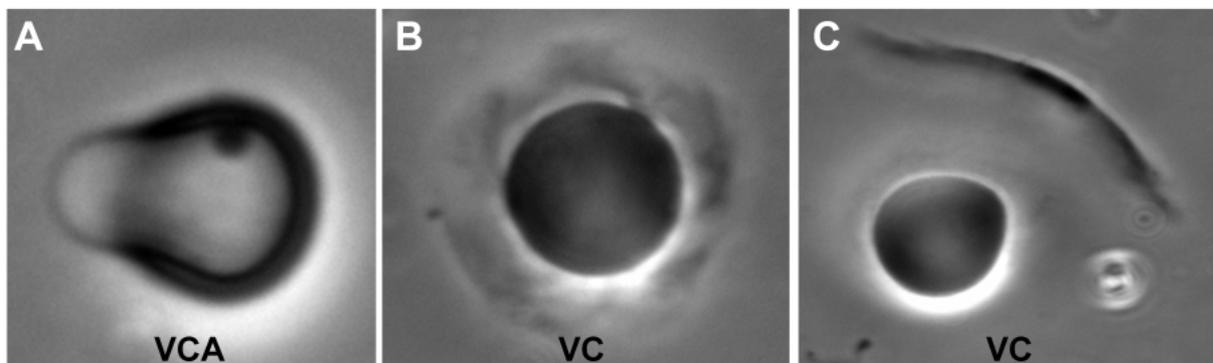
Les vésicules recouvertes de V n'initient pas la formation d'une coque d'actine ni de comète d'actine : il n'y a pas de mouvement. Ce résultat n'est pas surprenant car le fragment V ne possède pas le domaine CA permettant de recruter le complexe Arp2/3 : il n'y a donc pas génération d'un réseau branché. Il est probable que V permette de capturer des filaments individuels mais il n'a pas été possible de les observer : leur faible nombre ne permet sans doute pas de les distinguer du bruit de fond en microscopie de fluorescence.

### 3°) Le comportement motile des vésicules VC est différent de celui des vésicules N-WASP et VCA

#### a) Expulsion initiale

Alors que VC ne forme pas de filaments branchés en solution avec Arp2/3, on assiste à la formation d'un gel d'actine autour des vésicules VC. Ceci indique donc que le complexe Arp2/3 est utilisé par VC immobilisé à la membrane pour former un réseau branché. Les vésicules VC sortent de leur coque d'actine initiale différemment des vésicules N-WASP ou VCA : la brisure de symétrie s'effectue plus rapidement (en quelques minutes) sur les vésicules VC que sur les vésicules N-WASP. Pour N-WASP/VCA, le gel d'actine croît plus longtemps et les contraintes exercées sur la vésicule semblent élevées : il est fréquent d'observer des vésicules ne parvenant pas à sortir de la coque d'actine ou qui éclatent avant ou au cours de l'expulsion. Ce phénomène est beaucoup plus rare avec les vésicules VC. Après ouverture du gel, la vésicule N-WASP/VCA est expulsée de la coque de manière rapide et violente. Avec VC, la vésicule n'est pas expulsée à proprement parler : on voit que la vésicule se déforme mais il n'y a pas de pic de vitesse. Le gel se polarise facilement et rapidement, sans à-coup, pour donner naissance à une comète (Figure IV-3).

De plus, la coque d'actine initiée par des vésicules VC semble moins réticulée que celle des vésicules VCA/N-WASP : en contraste de phase, elle apparaît beaucoup moins noire, suggérant que la densité d'actine est inférieure (Figure IV-2 A et B). Le gel d'actine est également beaucoup moins homogène (figure IV-2 B) : on peut observer d'importantes variations d'épaisseur dès l'initiation de la croissance du gel.

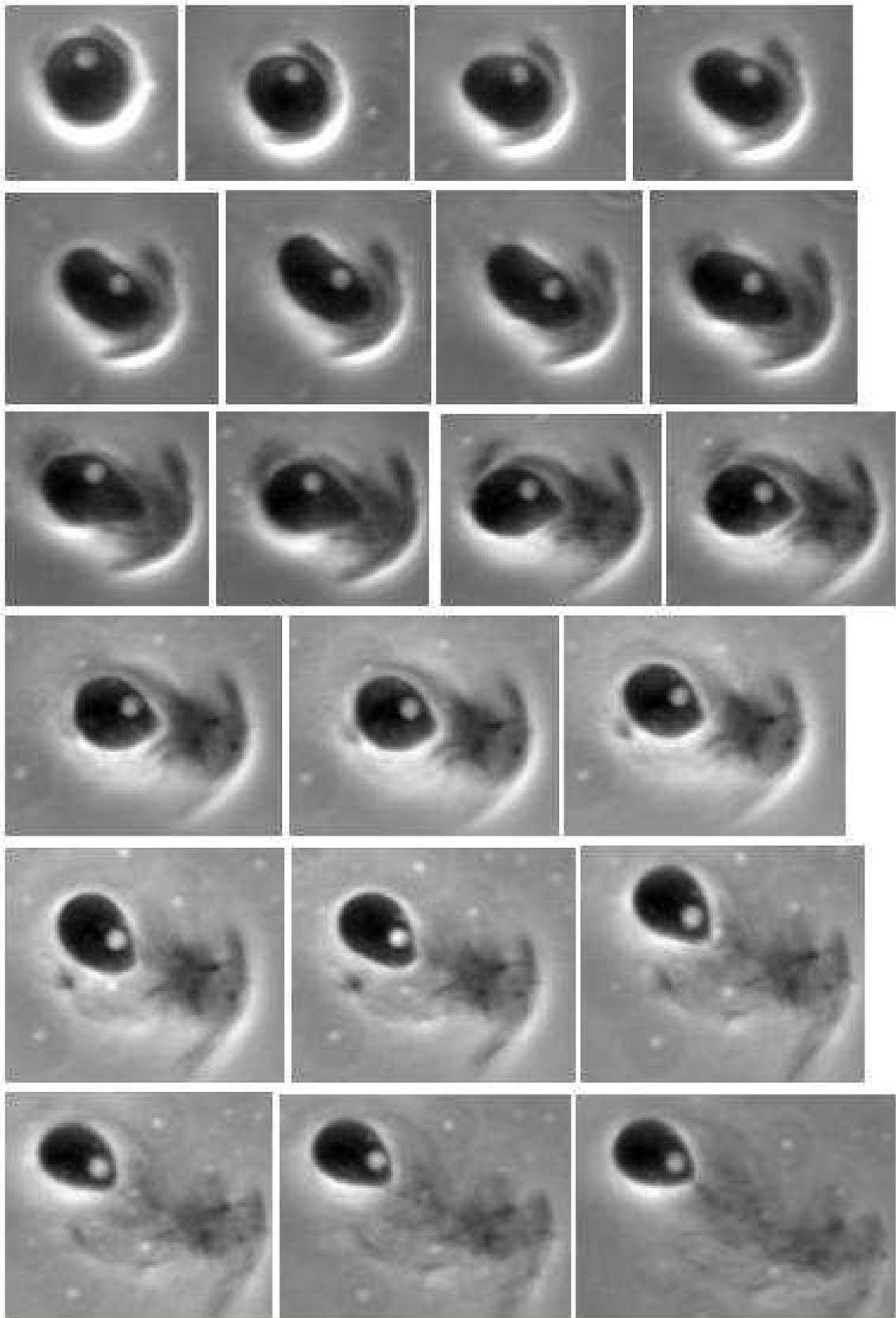


**Figure IV-2: Morphologie de gels d'actine de vésicules VCA ou VC (contraste de phase)**

*A : Vésicule VCA de 4 $\mu$ m de diamètre présentant une déformation caractéristique.*

*B : Vésicule VC de 4,8 $\mu$ m entourée d'un gel non symétrique avec de nombreux défauts.*

*C : Vésicule VC de 3,3 $\mu$ m dont le gel s'est déplié lors de la brisure de symétrie*



**Figure IV-3:** Séquence d'images en contraste de phase illustrant la brisure de symétrie et l'initiation du mouvement d'une vésicule VC de  $3\mu\text{m}$  (40s entre les images). La première image est prise environ 2 minutes après dilution des vésicules dans le milieu de motilité.

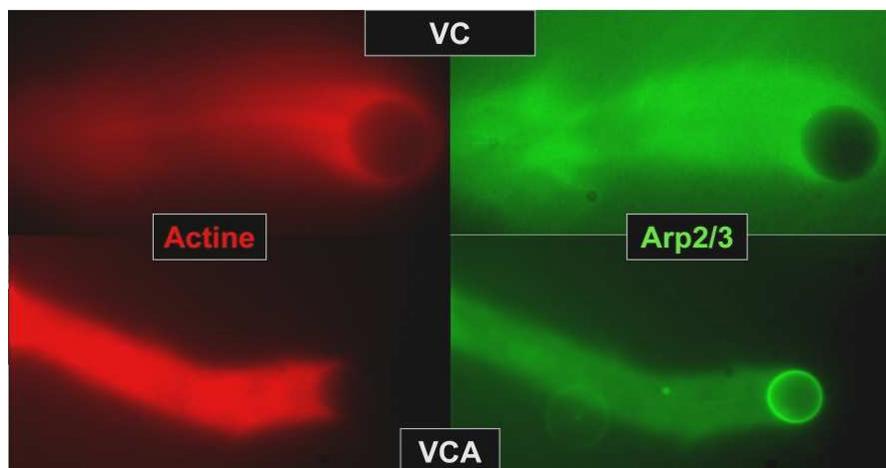
Il est raisonnable de penser que l'absence du domaine acide stabilisant l'interaction avec le complexe Arp2/3 diminue la fréquence de branchement, ce qui se traduit par la formation d'un gel moins réticulé et moins cohésif. Ceci favorise l'apparition de défauts dans le gel et facilite la brisure de symétrie, d'une part, et induit la formation d'un gel qui exerce moins de contrainte sur les vésicules, d'autre part.

Même si on n'observe pas de déformations avec étranglement de la vésicule dans le cas de VC (contrairement à N-WASP/VCA où ce phénomène est fréquent), on constate que les vésicules sont nettement déformées au cours de l'expulsion, bien que le gel d'actine soit moins réticulé que celui généré par VCA. La densité du gel d'actine n'apparaît donc pas être un facteur limitant pour déformer la vésicule, en tout cas pas dans la gamme utilisée ici.

Le fait que le réseau de filaments soit plus lâche, et donc plus fragile, facilite l'expulsion de la vésicule. En outre, l'augmentation de la distance entre deux points de réticulation augmente la flexibilité du gel et lui permet d'emmagasiner une contrainte mécanique plus importante que le gel très réticulé généré par VCA/N-WASP. Ainsi, on observe fréquemment l'ouverture du gel après l'expulsion des vésicules VC (Figures IV-2C et IV-3), ce qui indique que le gel continue de relaxer le stress accumulé. Au contraire, lorsque les vésicules VCA sont expulsées, le gel n'évolue plus et reste relativement fermé en forme de U (Figure II-6)

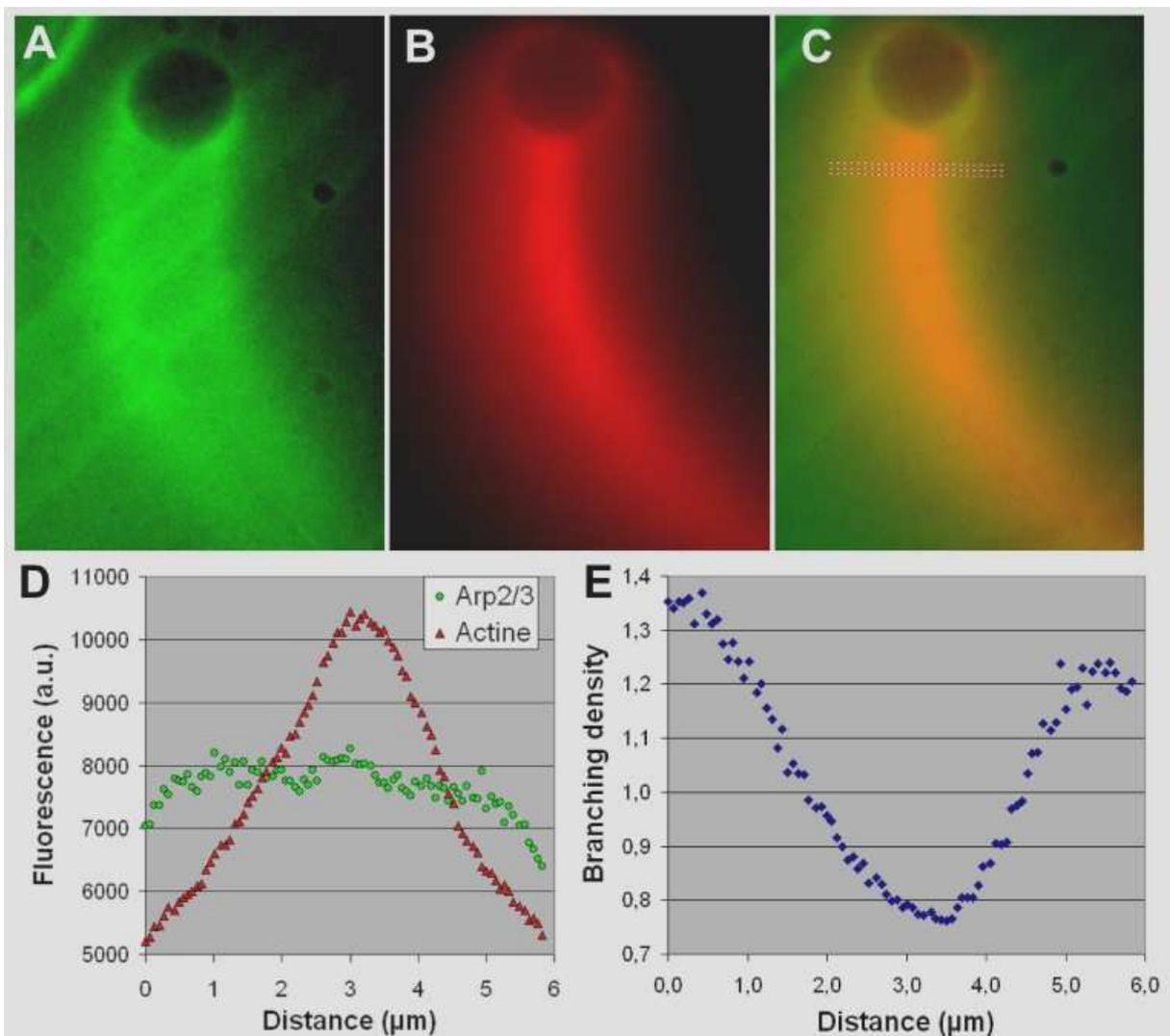
### ***b) Morphologie des comètes des vésicules VC***

Nous avons également analysé les caractéristiques des comètes initiées par les vésicules VC. Leur morphologie très particulière indique que la délétion du domaine acide a des conséquences sur le mécanisme de propulsion. Le centre de la comète présente une importante surdensité d'actine qu'on ne retrouve pas en Arp2/3 (Figure IV-4).



**Figure IV-4 : Vésicules VC de 5,5 $\mu$ m (en haut) et VCA de 4,2 $\mu$ m (en bas) observées en double fluorescence d'actine-rhodamine (en rouge) et d'Arp2/3-Alexa 488 (en vert). La vésicule VC n'est pas recouverte d'Arp2/3, contrairement à la vésicule VCA, et présente une surdensité d'actine au centre de la comète.**

Il existe donc au centre de la comète une surdensité locale de filaments qui contiennent une faible densité de Arp2/3 et donc sont très peu branchés. Pour conforter cette idée, nous avons mesuré la densité de branchement Arp2/3:actine en coupe de la comète (Figure IV-5). Alors que le signal de fluorescence de l'actine atteint son maximum au centre de la comète, celui de Arp2/3 est constant sur toute la largeur de la comète. La densité de branchement est alors deux fois plus faible au centre que sur les bords de la comète. Elle est également  $\sim$  trois fois plus faible que la densité de branchement mesurée dans les comètes de vésicules VCA.



**Figure IV-5 : La densité de branchement est deux fois plus faible au centre des comètes que sur les bords.**

*A-C : Images en actine-rhodamine (B), Arp2/3-Alexa 488 (A), et superposées (C) d'une vésicule VC de 4,4 μm.*

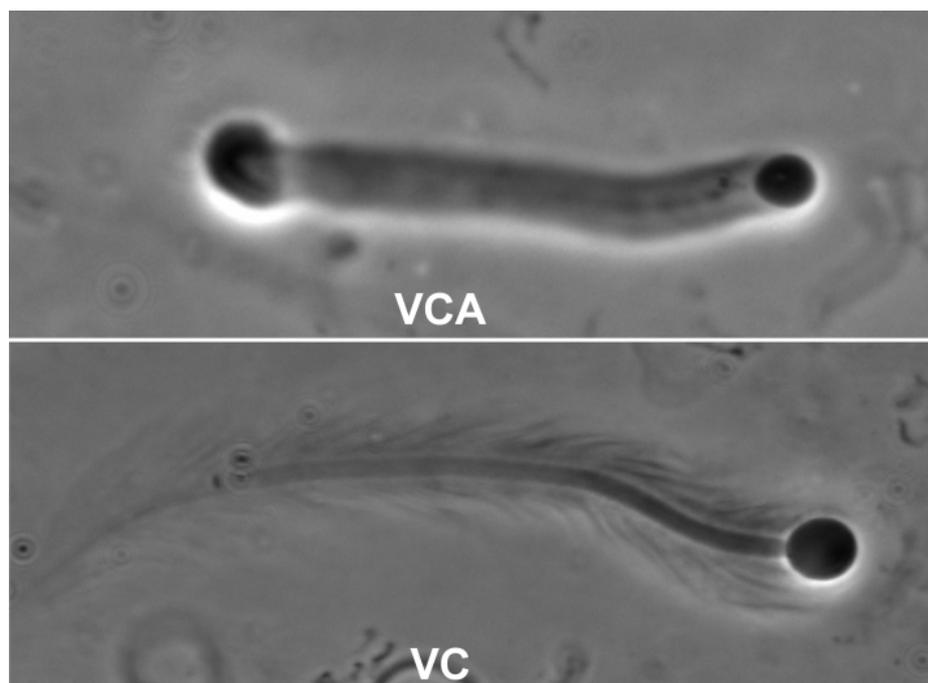
*D, E : Profil des intensités de fluorescence d'actine et d'Arp2/3 (D) et de la densité de branchement (E) le long de la ligne de scan tracée en (C).*

La vitesse de propulsion des vésicules VC est environ deux fois plus élevée que celle des vésicules VCA. Ce résultat va dans le sens de la co-existence de deux populations de filaments d'actine :

- les filaments connectés à la vésicule via le complexe Arp2/3 qui la retiennent et qui freinent la propulsion,
- les filaments qui sont libres de s'allonger contre la paroi de la vésicule et qui participent efficacement au mouvement.

La densité de branchement dans les comètes des vésicules VC étant plus faible que dans celles des vésicules VCA, il y a moins de filaments connectés à la vésicule, le mouvement est donc plus rapide.

La comète d'actine des vésicules VC présente une autre singularité : on distingue sur le côté des faisceaux de filaments dirigés vers l'extérieur (Figure IV-6). Cette morphologie particulière des comètes VC rappelle celle des comètes d'actine observées avec des billes N-WASP lorsque le rapport gelsoline:actine est inférieur à 1:500. Les comètes ont un aspect qui rappelle des « arêtes de poisson », dû à des faisceaux de filaments qui forment un angle de 70° avec l'axe de la comète d'actine (Pantaloni et al. 2000). Le faible taux de coiffe des filaments provoque une augmentation de la longueur moyenne des filaments : les longs filaments situés au bord de la comète sont alors susceptibles de sortir de l'axe de la comète pour s'allonger vers l'extérieur.

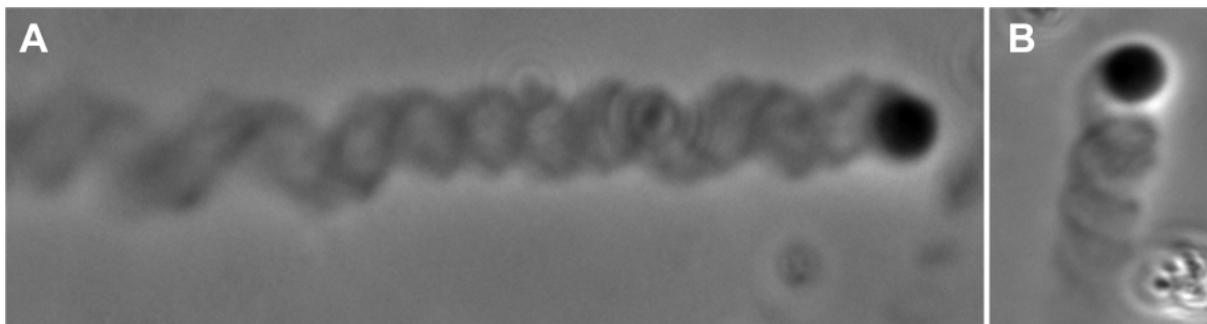


**Figure IV-6 : Différences de morphologie entre les comètes d'une vésicule VCA de 5 µm (en haut) et d'une vésicule VC de 6 µm (en bas) visibles en contraste de phase.**

Bien que le phénotype des vésicules VC présente quelques similarités avec celui des billes N-WASP en présence d'une concentration suboptimale de gelsoline, il est sensiblement différent par exemple par l'existence d'une structure axiale dense, et le phénotype semble indépendant de la concentration de gelsoline. La morphologie observée chez les vésicules VC ne peut donc pas être imputée à la présence de filaments longs, non coiffés, parvenant à s'échapper de la comète.

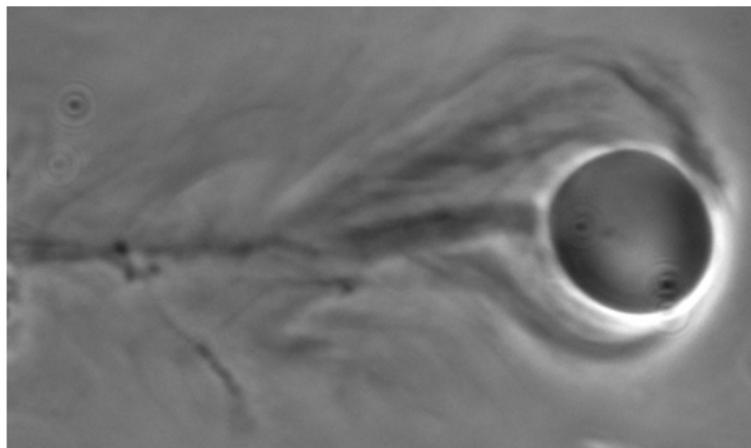
La concentration de gelsoline affecte en revanche le nombre de vésicules VC formant des comètes et leur vitesse moyenne de propulsion, de manière identique à ce qui a déjà été observé pour le mouvement des billes N-WASP (Wiesner et al. 2003). Le nombre de vésicules formant des comètes est quasi nul en l'absence de gelsoline, il augmente à partir de 25 nM pour atteindre un maximum autour de 100 nM, puis diminue progressivement entre 200 et 400 nM où il est quasi nul. En l'absence de gelsoline, la vitesse des rares vésicules en mouvement est très faible ; elle augmente avec la concentration de gelsoline pour atteindre un maximum autour de 100 nM ; au-delà, elle diminue pour devenir quasiment nulle à 400 nM gelsoline.

Les vésicules VC par ailleurs montrent un défaut de directionnalité de leur mouvement. Les comètes forment fréquemment des hélices et des spirales (Figure IV-7), et manifestent de fréquents changements de direction. Ces observations suggèrent que la structure peu branchée du réseau de filaments ne confère pas les propriétés mécaniques suffisantes pour le maintien de la directionnalité du mouvement.



**Figure IV-7: Vésicules VC propulsées par une comète en hélice (contraste de phase).**

Nous avons également observé la répartition du gel d'actine autour des vésicules VC pendant leur propulsion. Les figures IV-4, IV-5 et IV-6 montrent que le gel d'actine croît également à l'avant des vésicules. Ce phénomène ne s'accompagne pourtant pas de l'arrêt de la vésicule, à la différence des vésicules N-WASP. Cette observation suggère que les molécules de VC sont moins ségréguées que N-WASP et conservent une distribution homogène à la surface de la vésicule. Cette observation est en accord avec l'idée que la ségrégation de l'agent branchant est promue par la cohésion du gel réticulé qui est engendrée par l'activité de brachement. Les réseaux d'actine engendrés par les vésicules VC sont peu branchés, il y a donc peu de filaments connectés à la vésicule, ce qui favorise la diffusion des sites VC à la surface de la vésicule et la nucléation de filaments à l'avant de la vésicule. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la morphologie particulière des bords de comètes des vésicules VC est que les faisceaux latéraux correspondent à des fragments de gels initiés à l'avant de la vésicule qui, une fois détachés de la vésicule lors de la relaxation du gel d'actine, se trouvent sur les côtés de la comète au cours de la propulsion. Les faisceaux latéraux observés correspondraient à des structures résultant de l'ouverture successive d'un grand nombre de gels qui se reforment en permanence autour de la vésicule.



**Figure IV-6 : Image en contraste de phase d'une vésicule VC de 3,8  $\mu\text{m}$  propulsée par une comète d'actine. Le gel d'actine englobe l'avant de la vésicule et lorsqu'elle avance, des fragments de gel se retrouvent sur le côté de la comète.**

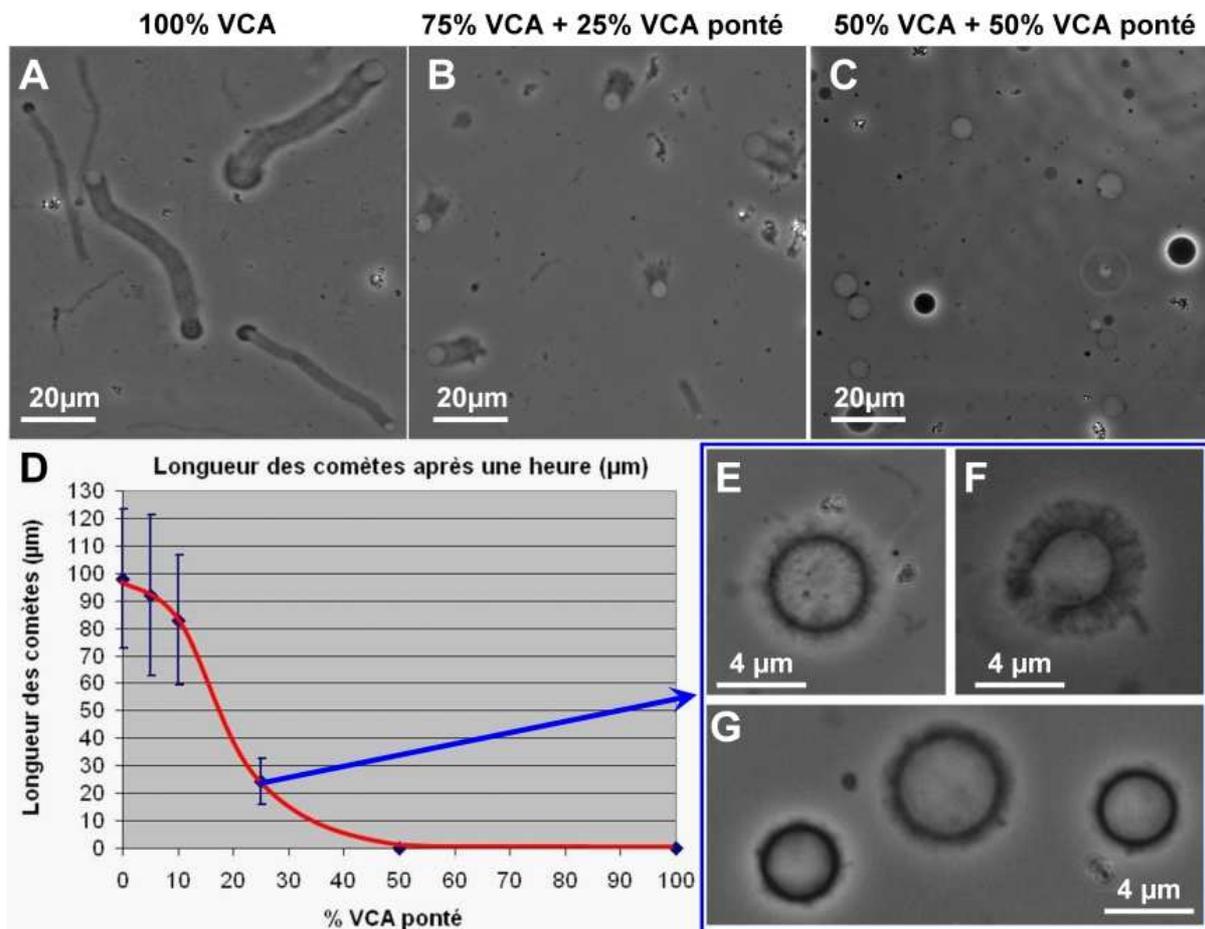
## **IV VCA covalamment lié à un monomère d'actine sur le domaine WH2.**

Nos travaux sur le mouvement saltatoire de liposomes suggèrent que l'interaction entre les filaments d'actine et N-WASP est transitoire. Dans le mécanisme moléculaire proposé, nous considérons que l'interaction entre les activateurs et les filaments d'actine se fait par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 lié à la partie CA de N-WASP. D'autre part, les études biochimiques faites au laboratoire (Egile et al. 1999; Pantaloni et al. 2000) ont montré que le domaine WH2 de N-WASP fixait l'actine d'une manière fonctionnellement homologue à la profiline, c'est à dire que le complexe WH2-G-actine peut participer à l'assemblage des filaments à l'extrémité barbée. Il a été proposé que cette activité du domaine WH2 pouvait être intégrée dans l'activité de branchement et que le complexe ternaire VCA-actine-Arp2/3 interagissait avec l'extrémité barbée d'un filament mère pour initier la formation de la jonction branchée. Cette hypothèse a été confortée par une étude récente de Co et al. (Co et al. 2007) qui a montré également une interaction directe entre les filaments d'actine et le domaine WH2 de N-WASP associé à une molécule de G-actine. Dès lors, il semble donc bien y avoir deux voies d'interaction possibles entre les filaments d'actine et l'activateur : directe, via le domaine WH2 en complexe avec l'actine G, ou indirecte, via VCA liant le complexe Arp2/3. La question importante qui se pose est la séquence des réactions qui suivent l'interaction de WH2-g-actine avec une extrémité barbée, dans le contexte normal de branchement, c'est-à-dire dans les conditions où le domaine CA peut interagir avec Arp2/3. Pour répondre à cette question, j'ai fonctionnalisé des vésicules avec du VCA dont un des domaines WH2 a été ponté chimiquement à un monomère d'actine (appelé VCA-actine par la suite). Ce pontage covalent empêche donc la dissociation de VCA de la jonction branchée.

En solution, le produit covalent VCA-actine possède la même activité de branchement que VCA seul. En revanche, les vésicules incubées avec différentes concentrations (100 nM à 1  $\mu$ M) de VCA-actine pendant une durée variable (2 à 12 heures) ne forment ni gel d'actine ni comète, tandis que des vésicules VCA forment des comètes en 30 minutes dans les mêmes conditions. L'utilisation d'actine fluorescente n'a pas permis de distinguer de réseau d'actine à la surface des vésicules VCA-actine : soit il n'y a pas de filaments, soit ils sont trop peu nombreux pour être distingués du bruit de fond.

J'ai alors fonctionnalisé des vésicules « hybrides » incubées en présence de VCA et VCA-actine en proportions variables. A concentration totale d'incubation ([VCA] + [VCA-

actine]) constante, j'ai observé que, plus la proportion de VCA-actine covalent augmente, plus le nombre de vésicules initiant des comètes et leur vitesse de propulsion moyenne diminuent. Les vésicules 100% VCA forment de longues comètes ; les vésicules incubées avec 75% de VCA et 25% de VCA-actine forment seulement des gels mais pas de comète ; au-delà de 50% de VCA-actine, on n'observe plus de gel autour des vésicules (Figure IV-7). Ces résultats ont été reproduits à des concentrations totales (VCA + VCA-actine) de 250 et 500 nM dans le milieu d'incubation. Il semble donc que l'inhibition du mouvement soit bien due à VCA-actine covalent plutôt qu'à un défaut de VCA actif à la surface des vésicules.



**Figure IV-7 : Vésicules hybrides fonctionnalisées à la fois avec VCA et VCA ponté.**

*A, B, C :* Vésicules comportant respectivement 100% de VCA (A), 75% de VCA + 25% de VCA ponté (B), 50% de VCA + 50% de VCA ponté (C) après une heure.

*D :* Longueur des comètes d'actine après une heure selon la proportion de VCA ponté

*E, G, F :* Exemples de gels d'actine initiés par des vésicules fonctionnalisées avec 75% de VCA + 25% de VCA ponté.

Ces résultats indiquent que VCA-actine inhibe la formation d'un réseau de filaments branchés à la surface des vésicules. Pour confirmer que ce résultat n'est pas dû à la déplétion

du VCA par compétition avec VCA-actine, j'ai répété l'expérience en incubant les vésicules avec 500 nM VCA et des quantités supplémentaires de VCA-actine. Les résultats obtenus sont analogues aux précédents, ce qui suggère que VCA-actine empoisonne la croissance du gel d'actine par VCA.

Ces résultats sont en accord avec le modèle selon lequel la déstabilisation de l'interaction avec VCA lors de l'incorporation du monomère d'actine dans la branche conduit au détachement du filament branché, permettant l'élongation des filaments mère et fille (Le Clainche et al. 2003)

La première explication serait que le détachement du monomère d'actine du domaine VCA est requis pour permettre l'élongation des filaments mère et fille. Or le complexe covalent VCA-actine est capable de brancher les filaments en solution. Le détachement du monomère d'actine ne semble donc pas requis pour permettre l'élongation des filaments mère et fille en solution. En revanche, lorsque VCA est immobilisé sur une surface, le détachement du filament branché est bien évidemment requis pour le mouvement (Kelly et al. 2006). L'attachement permanent d'un petit nombre de jonctions branchées serait donc suffisant pour empoisonner le mouvement.

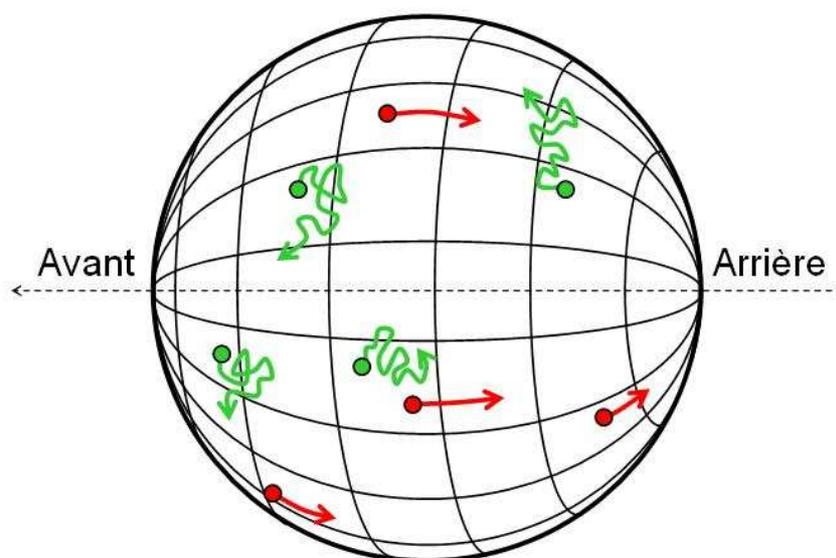
En conclusion, les différences observées entre VCA-actine en solution et immobilisé sur un support suggèrent que le positionnement de VCA joue un rôle crucial dans son activité, et que des changements de conformation du complexe VCA-Arp2/3-actine sont probablement nécessaires pour que le mécanisme de branchement soit viable.

## V Modèles théoriques de ségrégation-diffusion.

### 1°) Principe

Le but de cette partie est de voir si le mécanisme de ségrégation-diffusion décrit précédemment permet d'expliquer les profils de densité d'activateurs que nous avons mesurés. En nous basant sur la description du mécanisme donnée précédemment (figure III-18), nous avons calculé les profils de densité correspondants et les avons comparés à ceux obtenus expérimentalement. Nous calculons les profils de densité en nous basant sur l'existence de deux populations de N-WASP à la surface d'une vésicule propulsée en régime continu stationnaire (Figure IV-8 :

- Une population de sites N-WASP attachés à des filaments d'actine. Comme la vésicule avance par rapport à la comète d'actine, ces sites sont animés d'un mouvement opposé à celui de la vésicule. On note  $v$  la vitesse à laquelle les sites liés sont déplacés vers l'arrière de la vésicule au cours du mouvement.  $v$  est exprimée en  $\mu\text{m/s}$ . Comme on se place à l'état stationnaire, la vitesse de la vésicule est constante et la vitesse  $v$  ne dépend que de la position de l'activateur à la surface de la vésicule.
- Une population de sites N-WASP libres, c'est-à-dire non liés à un filament d'actine. Ces sites diffusent librement avec un coefficient de diffusion  $D$  exprimé en  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ .



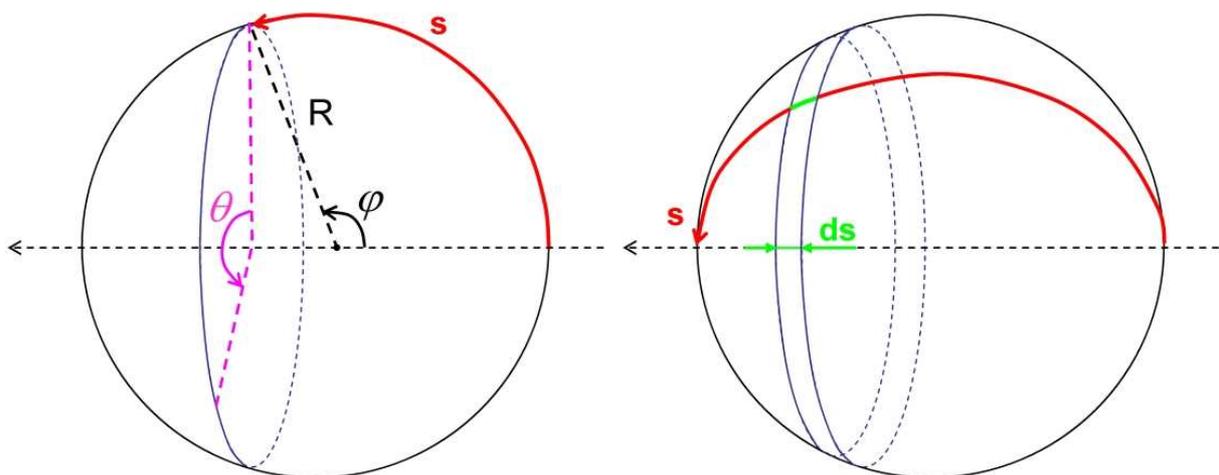
**Figure IV-8 : Les sites libres (en vert) diffusent librement tandis que les sites liés (en rouge) sont tirés vers l'arrière de la vésicule.**

Le but de ces calculs est de calculer la distribution théorique des densités surfaciques  $\sigma_u(s)$  et  $\sigma_b(s)$  de chacune des deux populations d'activateurs et de les comparer au profil de densité mesuré  $\sigma(s) = \sigma_u(s) + \sigma_b(s)$  qui correspond à la somme des deux populations.  $\sigma_u$  et  $\sigma_b$  sont deux fonctions inconnues qui dépendent de la position à la surface de la vésicule.

Nous avons vu que la liaison entre le filament et N-WASP est transitoire, ce qui signifie qu'il y a un échange permanent entre les deux populations de sites N-WASP. Les sites libres se lient aux filaments avec une vitesse d'attachement  $k_b$  et les sites liés s'en détachent avec une vitesse  $k_u$  et sont toutes deux exprimées en  $s^{-1}$ . Elles correspondent à l'inverse de la durée de vie moyenne de chaque état.

## 2°) Géométrie du système et conditions limites.

Nous considérons que la vésicule est une sphère de rayon  $R$  et que l'ensemble [ vésicule + comète] a une symétrie de révolution autour de l'axe du mouvement. Chaque point de la sphère peut être repéré par les angles  $\varphi$  et  $\theta$  mais la symétrie de révolution fait que le problème est indépendant de  $\theta$ . Ainsi, tous les paramètres et les densités surfaciques des activateurs ne dépendent que d'une variable dans l'espace : l'angle  $\varphi$ , ou la longueur d'arc  $s = R\varphi$ , qui varie de 0 à l'arrière de la vésicule à  $\pi R$  à l'avant de celle-ci (Figure IV-9)



**Figure IV-9: Chaque point d'une vésicule de rayon  $R$  est caractérisé par les angles  $\theta$  et  $\varphi$ . Comme le gel d'actine possède une symétrie de révolution autour de l'axe du mouvement, nos considérations ne dépendent pas de  $\theta$  mais seulement de  $\varphi$  ou de la longueur de l'arc  $s$  qui peut varier de 0 à l'arrière de la vésicule à  $\pi R$  à l'avant de celle-ci.**

Le fait que le système soit fermé impose que le flux des sites N-WASP soit nul à l'avant ( $s=\pi R$ ) comme à l'arrière de la vésicule ( $s=0$ ). Les conditions limites s'écrivent donc :

$$J_b(s=0) = J_u(s=0) = J_b(s=\pi R) = J_u(s=\pi R) = 0 \quad (1)$$

où  $J_b(s)$  et  $J_u(s)$  correspondent respectivement au flux des sites liés et libres

Les sites liés ont une densité surfacique  $\sigma_b$ . Ils ne diffusent pas mais sont tirés vers l'arrière de la vésicule à une vitesse  $v$ . Le flux des sites liés s'écrit :

$$J_b(s) = -v(s) \cdot \sigma_b(s) \quad (2)$$

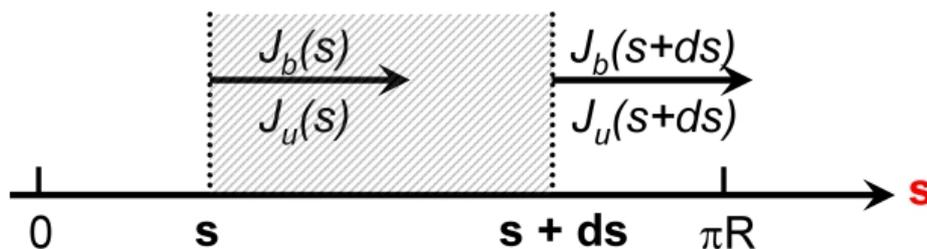
Les sites libres ont une densité surfacique  $\sigma_u$  et diffusent avec un coefficient de diffusion  $D$ .

Le flux des sites libres s'écrit selon la loi de Fick :

$$J_u(s) = -D \frac{\partial}{\partial s} \sigma_u(s) \quad (3)$$

### **3°) Bilan des flux à l'état stationnaire.**

Afin d'écrire les équations différentielles caractérisant le régime stationnaire, effectuons le bilan des flux pour chacune des deux populations de N-WASP à travers d'une petite bande d'épaisseur  $ds$  (Figure IV-10)



**Figure IV-10 : Bilan des flux sur une bande d'épaisseur  $ds$  pour les sites N-WASP libres et liés à un filament d'actine**

a) **Bilan sur les sites N-WASP liés à un filament d'actine.**

Le flux total de sites liés entrant dans la bande d'épaisseur  $ds$  égale la consommation nette de sites liés dans cette bande.

$$J_b(s) - J_b(s + ds) = (k_u \sigma_b(s) - k_b \sigma_u(s)) ds$$

Lorsque  $ds$  tend vers 0, cela donne  $\frac{\partial}{\partial s} J_b(s) = k_b \sigma_u(s) - k_u \sigma_b(s)$

D'après l'équation (2), on a donc:

$$\frac{\partial}{\partial s} [v(s) \cdot \sigma_b(s)] = k_u \sigma_b(s) - k_b \sigma_u(s) \quad (4)$$

b) **Bilan des flux pour les sites N-WASP libres.**

De même, pour les sites libres et en tenant compte de l'équation (3), on a :

$$\frac{\partial}{\partial s} \left[ D \frac{\partial \sigma_u}{\partial s} \right] = k_b \sigma_u(s) - k_u \sigma_b(s) \quad (5)$$

A l'état stationnaire, et en considérant  $D$  constant, le couple d'équations différentielles à vérifier est donc le suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} -\frac{\partial}{\partial s} [v(s) \sigma_b(s)] = -\sigma_b(s) k_u(s) + \sigma_u(s) k_b(s) \\ -D \frac{\partial^2 \sigma_u}{\partial s^2} = \sigma_b(s) k_u(s) - \sigma_u(s) k_b(s) \end{array} \right. \quad (6)$$

**c) Flux total en régime stationnaire**

Comme on se place à l'état stationnaire, le flux total doit être nul en tout point de la surface :

$$J_b(s) + J_u(s) = 0 \text{ soit } v(s) \sigma_b(s) + D \frac{\partial}{\partial s} \sigma_u(s) = 0, \text{ ce qui donne :}$$

$$\sigma_b(s) = -\frac{D}{v(s)} \frac{\partial \sigma_u}{\partial s} \quad (7)$$

Le couple d'équations différentielles (6) est équivalent à :

$$\left\{ \begin{array}{l} D \frac{\partial^2 \sigma_u}{\partial s^2} = D \frac{k_u(s)}{v(s)} \frac{\partial \sigma_u}{\partial s} + k_b(s) \sigma_u(s) \\ \sigma_b(s) = -\frac{D}{v(s)} \frac{\partial \sigma_u}{\partial s} \end{array} \right. \quad (8)$$

Ce système d'équations différentielles ne peut être résolu analytiquement, à moins que  $D$ ,  $v$ ,  $k_b$ , and  $k_u$  soient tous constants, auquel cas  $\sigma_u(s)$  et  $\sigma_b(s)$  seraient des exponentielles et les conditions limites ne seraient pas satisfaites (équation 1). Nous avons utilisé la méthode de linéarisation d'Euler pour résoudre numériquement le système d'équations différentielles (8)

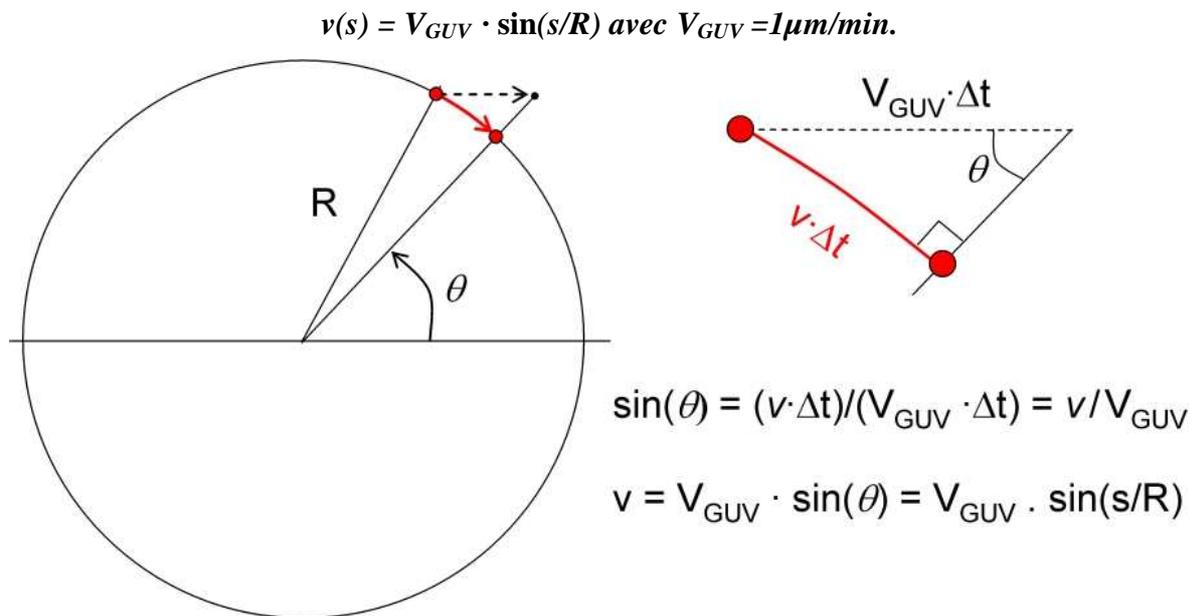
**4\*) Choix des paramètres  $v$ ,  $k_u$ ,  $k_b$  et  $D$ .**

**a) Coefficient de diffusion  $D$ .**

La constante de diffusion devrait être de l'ordre de  $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Pour simplifier les calculs, nous considérons que  $D$  ne dépend pas de la position sur la vésicule, ce qui revient à supposer la diffusion des sites libres n'est pas gênée par la présence des sites N-WASP connectés au gel d'actine. Bien qu'on puisse s'attendre à ce que les sites liés soient à l'origine d'une diminution du coefficient de diffusion des sites libres et favorise leur confinement, le nombre de sites N-WASP connectés au gel d'actine est vraisemblablement faible et cet effet doit être modéré. En effet, la surface des vésicules est loin d'être saturée par N-WASP : la distance moyenne mesurée entre deux N-WASP voisins (libre ou liés à un filament d'actine) est de l'ordre de 18 nm à l'arrière des vésicules. Cette valeur est relativement élevée comparée à la taille approximative d'une molécule de N-WASP (environ 3 nm).

**b) Vitesse  $v$  de déplacement des sites liés vers l'arrière de la vésicule.**

Les sites N-WASP liés à un filament d'actine sont tirés vers l'arrière de la vésicule, qui est propulsée à une vitesse  $V_{GUV}$  par rapport au gel d'actine. Les sites N-WASP liés sont tirés vers l'arrière de la vésicule selon une direction parallèle à l'axe du mouvement mais comme ils restent attachés à la surface de la vésicule, leur déplacement pendant un temps  $dt$  correspond à la projection de  $V_{GUV} \cdot dt$  à la surface de la vésicule (Figure IV-11) :



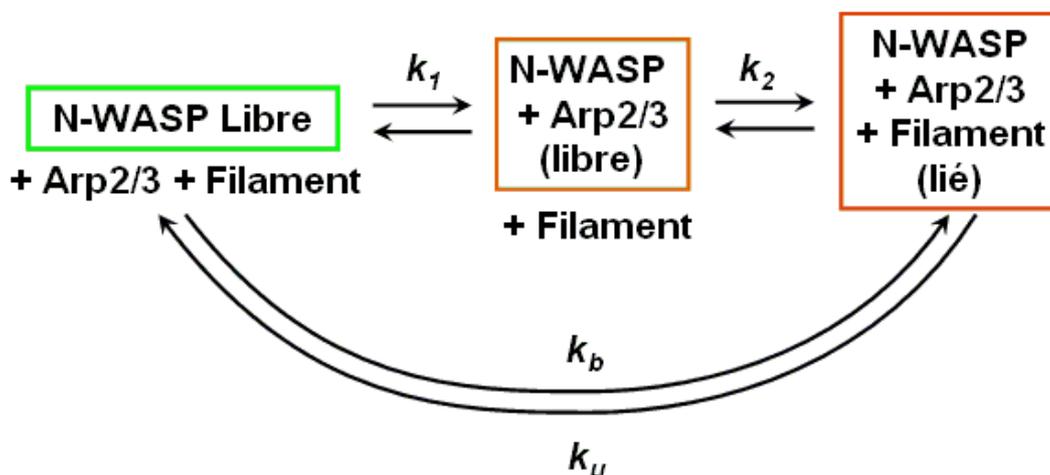
**Figure IV-11: Les sites N-WASP liés à un filament d'actine sont tirés vers l'arrière de la vésicule à une vitesse correspondant à la projection de  $V_{GUV} \cdot dt$  sur la surface de la vésicule soit  $v(s) = V_{GUV} \cdot \sin(s/R)$  où  $V_{GUV}$  est la vitesse de propulsion de la vésicule, soit  $1\mu\text{m}/\text{min}$  en moyenne.**

**c) Vitesses d'attachement et de détachement :  $k_b$  et  $k_u$**

La vitesse de détachement  $k_u$  correspond à l'inverse du temps de liaison entre N-WASP et un filament. En effectuant un calcul rapide de la proportion de filaments liés, on peut estimer que la durée de la liaison N-WASP-activateur est selon toute vraisemblance inférieure à 1 ou 2 secondes, cette valeur de  $1\text{s}^{-1}$  constitue la borne supérieure de  $k_u$ . Nous avons testé différentes valeurs de  $k_u$  dans les calculs : ces calculs montrent que c'est la valeur du rapport  $k_u / k_b$  qui compte et non pas la valeur absolue du  $k_u$ . Ce résultat traduit le fait que la proportion de filaments attachés et détachés est à l'équilibre pendant le mouvement.

Ces calculs ne prennent pas en compte le fait que la présence du gel d'actine affecte à la fois le taux d'attachement et le taux de détachement. En effet, le taux de détachement dépend de la force exercée sur la liaison N-WASP-Arp2/3-filament. Lorsque les sites liés à un filament d'actine se trouvent initialement sur le bord ou à l'avant de la vésicule, cette force se traduit par leur déplacement vers l'arrière de la vésicule. En revanche, les sites situés à l'arrière de la vésicule n'ont pas la possibilité de répondre à cette tension en se déplaçant, ce qui a pour conséquence de d'augmenter la tension qui s'exerce sur la liaison N-WASP-Arp2/3-filament. Le taux de détachement est donc susceptible d'être plus élevé à l'arrière de la vésicule. Cette probable inhomogénéité du taux de détachement à la surface de la vésicule n'est pas prise en compte dans les calculs.

Le taux d'attachement  $k_b$  correspond à l'inverse du temps pendant lequel un site N-WASP reste libre de diffuser avant de se lier à un filament d'actine. Ce temps comprend des étapes intermédiaires successives : le recrutement d'Arp2/3 par N-WASP puis la capture du bout barbé d'un filament par Arp2/3. Ainsi, la vitesse d'attachement  $k_b$  dépend de la concentration d'Arp2/3 : plus la concentration d'Arp2/3 est élevée, plus un filament a de chances de se lier rapidement à un site N-WASP libre et plus  $k_b$  augmente. Pour une raison identique,  $k_b$  augmente avec la densité d'actine. Les calculs ont été réalisées dans plusieurs cas de figure : avec  $k_b$  constante ou avec  $k_b$  variant de manière similaire à la densité d'actine mesurée en fluorescence.



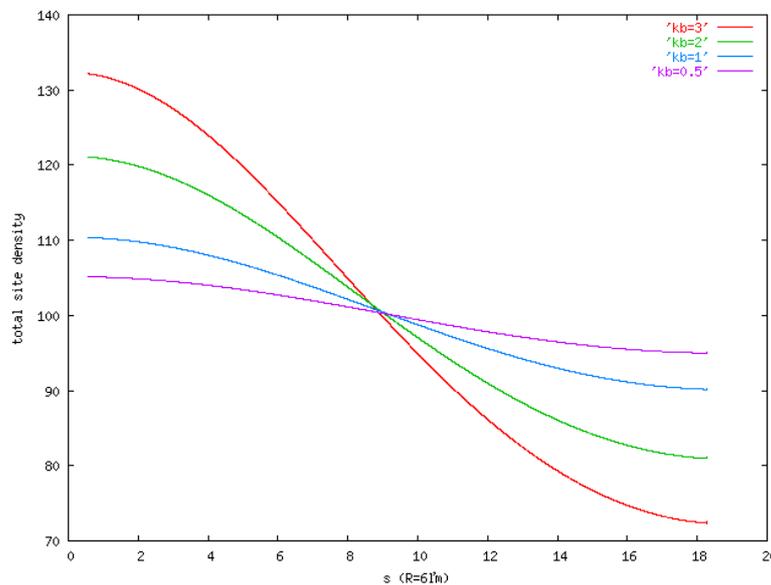
**Figure IV-12: L'attachement de N-WASP à un filament d'actine se fait en deux étapes : N-WASP libre lie d'abord le complexe Arp2/3 avec une constante de temps  $k_1$  puis le complexe N-WASP-Arp2/3 se lie à un filament d'actine avec une constante de temps  $k_2$ .**

## 5°) Résultats.

Dans les calculs, nous avons choisi un diamètre de  $R$  de  $6 \mu\text{m}$ . Lorsque nous avons considéré des profils de densité d'actine expérimentaux, les calculs ont été effectués avec le rayon réel de la vésicule.

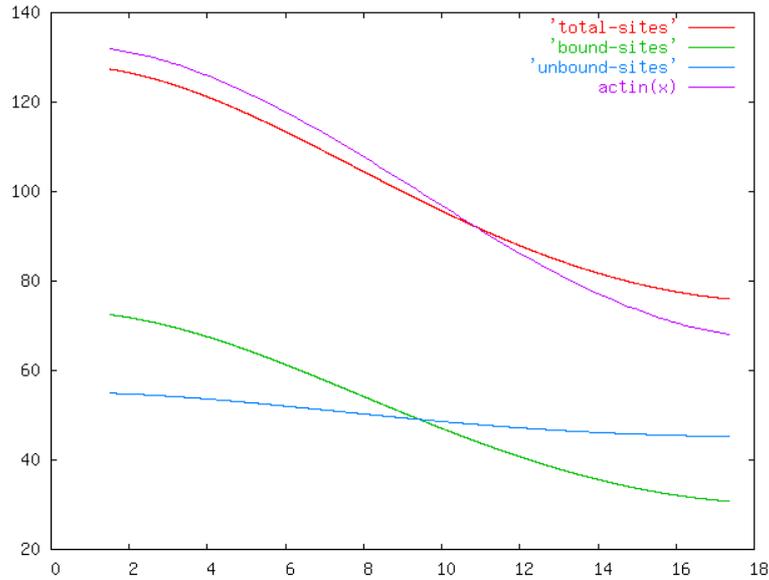
Les profils de densité de N-WASP obtenus avec les calculs sont en accord avec ceux mesurés expérimentalement. Lorsqu'on diminue la valeur de  $k_b$  pour rendre compte d'une faible concentration d'Arp2/3, on obtient bien un profil de N-WASP aplati, synonyme d'un faible taux de ségrégation, comme cela a été mesuré expérimentalement. Lorsque  $k_b$  varie selon une fonction  $0,33.\sin(s/R)$  correspondant grossièrement à la densité d'actine mesurée expérimentalement, on obtient des profils de densité de N-WASP similaires à ceux de l'actine mais légèrement moins ségrégués, confortant les résultats expérimentaux.

Enfin, les profils calculés permettent de déterminer un taux de ségrégation de 0,58 pour l'ensemble des sites (libres+liés) tandis que le taux de ségrégation est de 0,63 pour les sites liés. Or, les molécules d'Arp2/3 à la surface des vésicules correspondent à tous les sites N-WASP liés et une partie des sites N-WASP libre en complexe avec Arp2/3 mais non liés à un filament. Ces résultats sont donc en accord avec le fait que le taux de ségrégation mesuré pour Arp2/3 soit supérieur à celui de N-WASP.



**Figure IV-13: Profils de N-WASP calculés avec différentes valeurs du taux d'attachement  $k_b$  constantes autour de la vésicule.**

La vésicule a un diamètre  $R = 6 \mu\text{m}$  et est propulsée à une vitesse  $V_{\text{GUV}} = 1 \mu\text{m}/\text{min}$ . La vitesse  $v$  à laquelle les sites liés sont ramenés à l'arrière de la vésicule est une fonction sinus. La vitesse de détachement est constante et vaut  $k_u = 1 \text{ s}^{-1}$ . Les sites libres diffusent à une vitesse constante  $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . La vitesse d'attachement est constante et différentes valeurs ont été testées :  $0,5 \text{ s}^{-1}$  (courbe violette),  $1 \text{ s}^{-1}$  (courbe bleue),  $2 \text{ s}^{-1}$  (courbe verte) et  $2 \text{ s}^{-1}$  (courbe rouge)



**Figure IV-14: Profils des sites N-WASP libres et liés obtenus par les calculs.**

La vésicule a un diamètre  $R = 6 \mu\text{m}$  et est propulsée à une vitesse  $V_{GUV} = 1 \mu\text{m}/\text{min}$ . La courbe verte représente le profil de densité des sites N-WASP liés, la courbe bleue celui des sites libres, la courbe rouge correspond à l'ensemble des sites, c'est-à-dire la somme des sites libres et liés. La courbe violette représente le profil de densité d'actine calculée par une fonction analytique arbitraire servant aussi à rendre compte de la dépendance de  $k_b$  en fonction de la densité d'actine :  $k_b(s) = k_b(1 + 0.33 \cos(s/R))$  avec  $k_b = 30$ . La vitesse  $v$  à laquelle les sites liés sont ramenés à l'arrière de la vésicule est une fonction sinus. La vitesse de détachement est constante et vaut  $k_u = 30 \text{ s}^{-1}$ . Les sites libres diffusent à une vitesse constante  $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Comme cela a déjà été mentionné plus haut,  $k_b$  augmente avec la densité d'actine. Les calculs ont été réalisés dans plusieurs cas de figure : avec  $k_b$  constante (Figure IV-13) ou avec  $k_b$  variant proportionnellement à la densité d'actine mesurée en fluorescence (Figure IV-14). Lorsque  $k_b$  est constante ou dépend de la densité d'actine décrite par une fonction cosinus, le profil de N-WASP obtenu est symétrique et ne correspond pas parfaitement au profil expérimental, qui est beaucoup plus resserré.

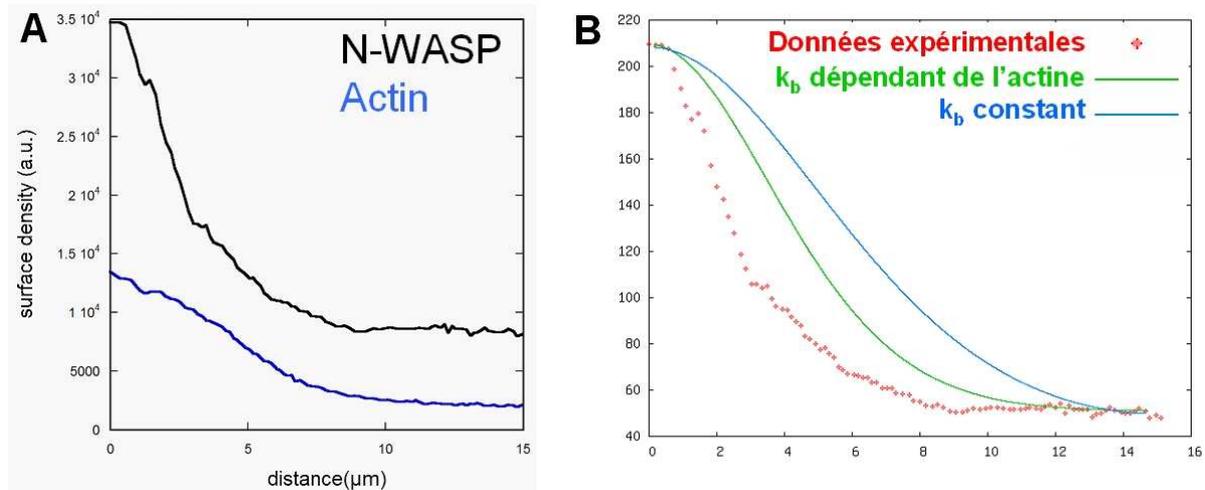
Afin de tenir compte avec justesse de l'effet de la densité d'actine sur la valeur de  $k_b$ , on se base sur les profils de densité expérimentaux et on considère que le passage de l'état libre à lié se fait en deux étapes. Jusqu'à présent, on considère que les filaments se lient au complexe N-WASP-Arp2/3. En réalité, N-WASP doit d'abord recruter et activer le complexe Arp2/3 avant de pouvoir se lier à un filament d'actine. La conséquence de ceci est que le temps  $\tau$  pendant lequel un site N-WASP reste libre correspond à la somme du temps  $\tau_1$  nécessaire pour recruter le complexe Arp2/3 et du temps  $\tau_2$  nécessaire au complexe N-WASP-Arp2/3 pour lier un filament d'actine.

La vitesse d'attachement totale  $k_b$  est alors définie par la relation suivante (Figure IV-12):

$$\frac{1}{k_b} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \text{ avec } k_1 = \frac{1}{\tau_1} \text{ et } k_2 = \frac{1}{\tau_2}$$

La vitesse d'attachement  $k_2$  dépend de la densité d'actine  $f_{Act}(s)$ :  
 $k_2 = k_{Act} \cdot f_{Act}(s)$ . Dans les calculs, on choisit une vitesse d'attachement  $k_1$  très élevée pour mettre en évidence le rôle individuel de la densité d'actine sur le  $k_b$ . En pratique, on prend  $k_1=10^6$ , ce qui revient à ne pas tenir compte de la première étape (recrutement du complexe Arp2/3 par N-WASP).

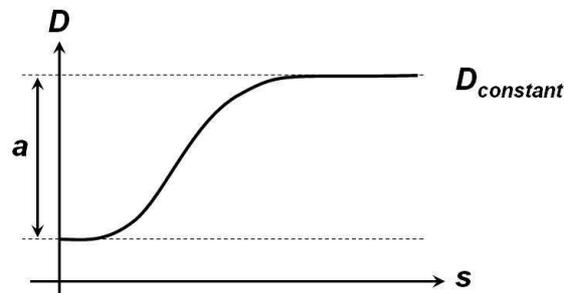
La densité d'actine est mesurée à partir de l'intensité de fluorescence. Pour que les profils d'actine soient comparables d'une image à l'autre, l'intensité de fluorescence est normalisée de manière à ce que la médiane soit voisine de 1. Le profil d'actine mesuré est ensuite approximé par une fonction analytique arbitraire de type gaussienne.



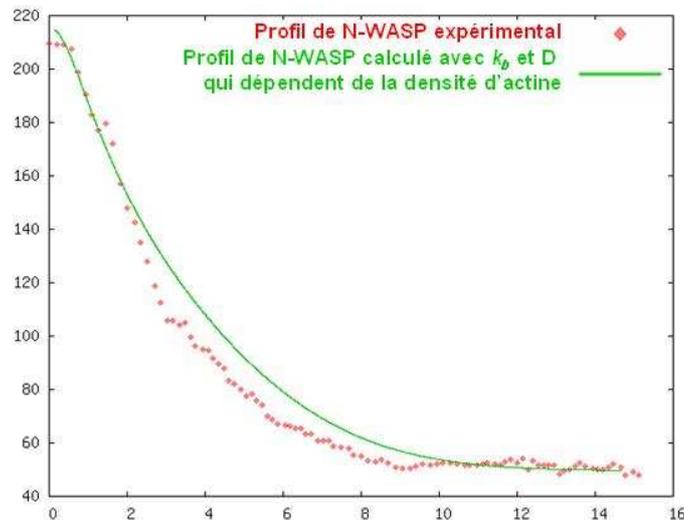
**Figure IV-15 : Profils de N-WASP expérimentaux et calculé avec un  $k_b$  constant ou dépendant de la densité d'actine.**

**A:** Distributions de N-WASP (en noir) et d'actine (en bleu) mesurées sur une vésicule de  $4,8\mu\text{m}$   
**B :** Le profil de N-WASP expérimental (courbe rouge en pointillés) est comparé à celui issu de calculs réalisés avec un  $k_b$  constant (courbe bleue) et avec  $k_b$  dépendant de la densité d'actin (courbe verte). Pour les calculs réalisés  $k_b$  constante,  $k_b=8,9$  et  $k_u=1$ . Pour les calculs réalisés avec  $k_b$  dépendant de la densité d'actine, le profil d'actine expérimental est approximé par la fonction gaussienne  $10800.exp-(x/5.53)^2+2080$  et  $k_u=3$ ,  $k_{act}=6.5$   
 La vésicule a un diamètre de  $4,8\mu\text{m}$  et sa vitesse est de  $V_{GUV} = 1\mu\text{m}/\text{min}$ .  $D=1\mu\text{m}^2/\text{s}$

On voit que le profil de N-WASP issu des calculs tenant compte de l'effet de la densité d'actine sur  $k_b$  est bien plus proche du profil expérimental que celui obtenu avec un  $k_b$  constant (Figure IV-15). Toutefois, il est possible de raffiner davantage les calculs en tenant compte du fait que la diffusion des activateurs libres est limitée par le gel d'actine, notamment à l'arrière de la vésicule, où la densité d'actine  $f_{Act}(s)$  est 4,2 fois plus élevée qu'à l'avant (Figure 24). Qualitativement, et en première approximation, le coefficient de diffusion est exprimé de la manière suivante pour rendre compte de cet effet:  $D(s) = D_{constant} (1 - a \cdot f_{Act}(s))$  où  $D_{constant}$  est le coefficient de diffusion de N-WASP à la surface de la vésicule en l'absence d'actine ( $D_{constant} = 1,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) et le coefficient  $a$  correspond au pourcentage du coefficient de diffusion perdu à cause du gel d'actine (figures IV-16 et IV-17)



**Figure IV-16 :** Le coefficient de diffusion  $D$  dépend de la densité d'actine le long de l'arc  $s$ .  $D_{constant}$  est le coefficient de diffusion de N-WASP en l'absence d'actine ( $D_{constant} = 1,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Le coefficient  $a$  correspond au pourcentage de diffusion perdu à cause de l'actine



**Figure IV-17:** Profils de N-WASP expérimental et calculé avec une vitesse d'attachement  $k_b$  et un coefficient de diffusion  $D$  qui dépendent de la densité d'actine.

Le profil de N-WASP expérimental (courbe rouge en pointillés) est comparé à celui issu de calculs réalisés avec un  $k_b$  et un coefficient de diffusion qui dépendent de la densité d'actine (courbe bleue).  $D = 1.1 (1 - 0,98 \exp(-x/7))^2$  et la densité d'actine expérimentale est approximée par la fonction gaussienne  $10800 \cdot \exp(-(x/5.53)^2 + 2080)$ . La vésicule a un diamètre de  $4,8 \mu\text{m}$  et sa vitesse est de  $V_{GUV} = 1 \mu\text{m}/\text{min}$ .  $k_u = 3.1$   $k_l = 25$ .  $k_{act} = 5$

# Chapitre V : Étude des forces générées par le gel d'actine

Cette partie théorique porte sur l'étude de la déformation par le gel d'actine des vésicules en mouvement continu (stationnaire). Ce travail est réalisé par Ruben Gracia, dans le groupe de Reinhard Lipowsky au Max Planck Institute of Colloids and Interfaces (Golm, Allemagne), dans le cadre d'une collaboration. Des travaux précédemment publiés ont consisté à déterminer la distribution des forces à partir de la forme de la vésicule (Giardini et al. 2003; Upadhyaya et al. 2003), (Boukellal et al. 2004), (Trichet et al. 2007). Ici, les forces mises en jeu sont les mêmes mais elles sont calculées à partir des distributions d'actine et de N-WASP à la surface de la vésicule pour prédire sa forme et la comparer à la forme expérimentale. Notre idée est que la forme de la vésicule dépend de l'équilibre entre l'action des sites N-WASP attachés au gel d'actine, qui exercent une force de traction vers l'arrière, et celle des filaments libres qui s'allongent et poussent contre la membrane.

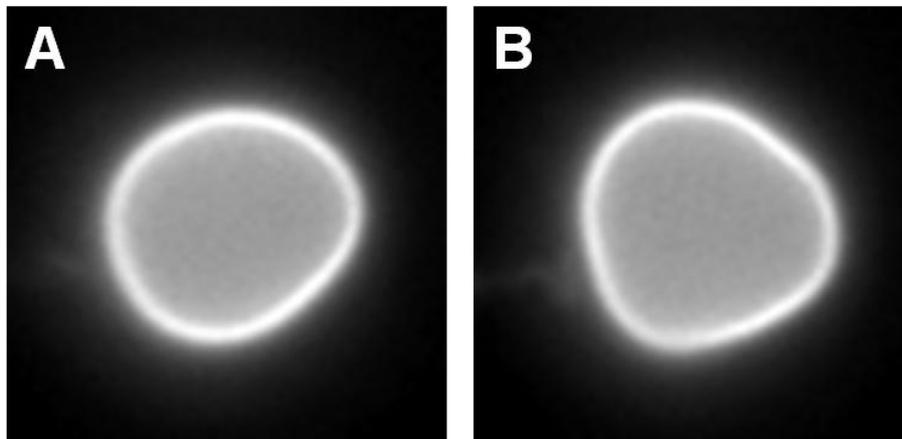
Ma contribution expérimentale à ce travail a consisté à acquérir des données en double-fluorescence de l'actine et de l'activateur sur des vésicules déformées pendant leur propulsion. R. Gracia a développé des programmes sous ImageJ pour mesurer les profils de distribution des deux protéines le long du contour des vésicules. Il a ensuite utilisé ces profils dans le calcul du bilan des forces appliquées sur les vésicules, pour remonter au calcul de leur contour. Dans un premier temps, nous avons estimé deux paramètres physiques des membranes, la rigidité de courbure  $\kappa$  et la tension de surface  $\Sigma$ , à partir de l'analyse des fluctuations des membranes.  $\kappa$  et  $\Sigma$  ont ensuite été intégrés dans le modèle de déformation de la vésicule.

Les principales hypothèses pour simplifier le calcul des forces sont les suivantes :

- en régime stationnaire, la forme des vésicules, donc son volume et sa surface, sont conservés ;
- l'ensemble [vésicule + gel d'actine] possède une symétrie de révolution autour de l'axe de son mouvement ;
- les protéines en solution (gelsoline, ADF, profiline) ne sont pas prises en compte pour le calcul de génération de force : on considère que seule l'interaction entre N-WASP et le gel d'actine est responsable de la déformation des vésicules.

## I Estimation de la tension de surface et la rigidité de courbure

La rigidité de courbure  $\kappa$  représente la flexibilité de la membrane. Elle correspond à l'énergie nécessaire pour courber la membrane. Dans un premier temps, j'ai suivi à haute fréquence (20 Hz) les fluctuations de vésicules fluorescentes (1% mol/mol de lipides-rhodamine) fonctionnalisées avec N-WASP dans leur solution de gonflement (i.e. en l'absence des protéines de la motilité) : il n'y a pas de gel d'actine qui croît autour des vésicules et la membrane ondule fortement (Figure V-1). Les contours des vésicules ont été analysés grâce à un programme développé sous ImageJ par R. Gracia. Pour que le programme puisse détecter le contour des vésicules, il a fallu observer des vésicules exemptes de défauts, avec un très bon rapport signal/bruit (pas d'autres vésicules ou de débris lipidiques à proximité de la vésicule étudiée). Avoir des films de qualité suffisante pour en faire une analyse automatique a nécessité beaucoup de temps et d'efforts. L'analyse des fluctuations d'un grand nombre de vésicules a permis de déduire une rigidité de courbure moyenne de  $1-3e^{-20}$  J. Cette valeur est cohérente avec la littérature et correspond à une rigidité de courbure assez faible.



**Figure V-1: Mesure des fluctuations de membrane en microscopie de fluorescence.**

*Images d'une même vésicule fluorescente de  $3,5\mu\text{m}$  de diamètre, acquises à 200ms d'intervalle.*

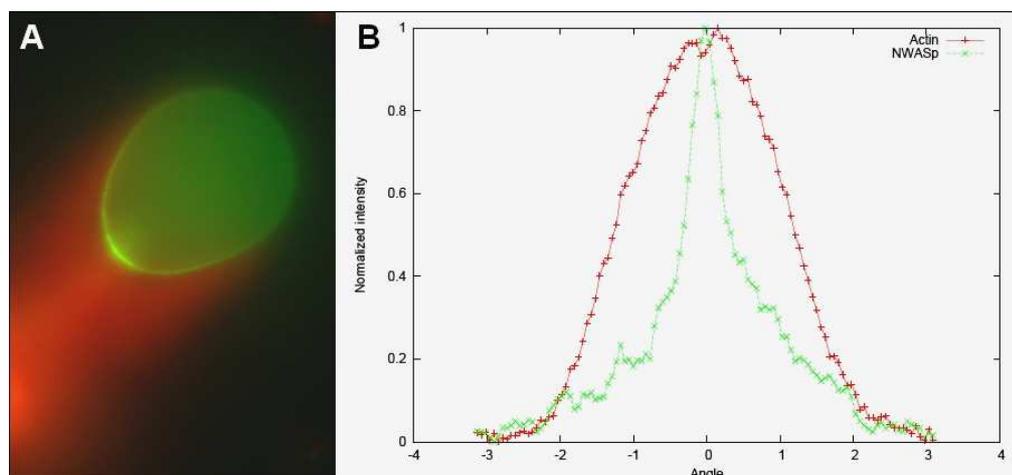
La tension de surface  $\Sigma$  correspond à l'énergie nécessaire pour augmenter l'aire de la membrane. Contrairement aux gouttelettes d'huile où la tension de surface est constante et la surface de la goutte variable, la surface des vésicules est constante et la tension de surface varie localement lorsque des forces tendent à l'étirer. Comme  $\Sigma$  n'est pas constante à la surface des vésicules, ce paramètre est difficile à estimer.

Les fluctuations d'une vésicule soumise à une perturbation extérieure sont modifiées, et l'analyse des fluctuations permet d'évaluer le changement de tension de surface (Kwok and Evans 1981). Dans notre cas, lorsque la membrane est comprimée par la croissance du gel d'actine, les fluctuations de membrane vont diminuer. Lorsque la rigidité de courbure est connue, cela permet d'estimer la tension de surface moyenne. J'ai donc mesuré les fluctuations de vésicules juste après les avoir placées dans le milieu de motilité, puis à différents temps lorsque le gel d'actine croît autour d'elles. Même si on ne peut observer que tardivement l'apparition du gel d'actine, celui-ci commence à croître très rapidement autour de la vésicule, ce qui rend très difficile la mesure des fluctuations à l'état initial sans gel d'actine. Nous n'avons donc pas pu obtenir une estimation de la tension de surface moyenne par ce type d'expériences.

A défaut de fournir une valeur moyenne de la tension de surface, ces expériences ont toutefois permis de déduire une limite inférieure de  $\Sigma$ . En effet, on constate qu'en présence du gel d'actine, les fluctuations de membrane ne sont plus détectables en microscopie optique. Comme le plus petit déplacement détectable correspond à la taille d'un pixel (environ  $10^{-7}$  m), on a pu en déduire que la tension de surface était au moins de l'ordre de  $10^{-5}$  N/m.

## **II Analyse des contours et mesure des densités d'actine et de N-WASP.**

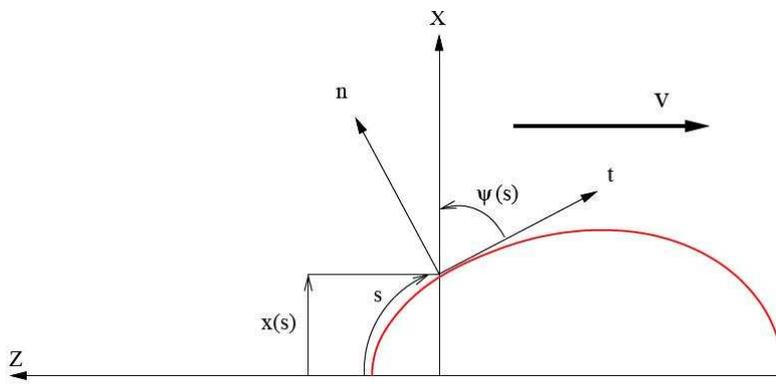
Les intensités de fluorescence de N-WASP-Alexa 488 et d'actine-rhodamine le long des contours de vésicules ont été mesurées expérimentalement par microscopie de fluorescence (Figure V-2A).



**V- 2 : Distribution de N-WASP et d'actine sur une vésicule de 6  $\mu\text{m}$ .**

**A)** Images en fluorescence de N-WASP-Alexa 488 (en vert) et d'actine-rhodamine (en rouge).  
**B)** Profils de densité de N-WASP (en vert) et d'actine (en rouge) normalisés mesurés par l'algorithme de détection de contour écrit sous ImageJ.

L'analyse des images est réalisée avec un algorithme développé sous ImageJ par R. Gracia. Le contour de la vésicule est déterminé à partir de l'image en fluorescence d'Alexa 488. Les profils d'intensité de l'actine et de N-WASP sont ensuite mesurés le long du contour de la vésicule et les intensités sont normalisées entre 0 et 1 (Figure V-2B). Les profils d'actine et de N-WASP sont ensuite lissés dans le but d'obtenir deux fonctions continues  $f_{act}(s)$  et  $f_{N-WASP}(s)$  décrivant les distributions d'actine et de N-WASP le long de l'arc  $s$  du contour de la vésicule. En première approximation, on considère que l'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la densité surfacique des protéines. La forme de la vésicule, déterminée à partir du profil d'intensité de N-WASP, est elle aussi lissée puis redimensionnée par rapport au rayon d'une sphère de même volume que la vésicule (Figure V-3).



**Figure V-3: Contour après lissage de la vésicule montrée en Fig. V-2, et systèmes de coordonnées utilisés pour décrire le système.**

*Z est l'axe de révolution de la vésicule.  $x$  correspond à la distance orthogonale allant d'un point de la membrane à l'axe Z.  $s$  est la longueur de l'arc décrivant le contour de la vésicule au départ du pôle arrière de la vésicule.  $\psi$  correspond à l'angle entre le vecteur tangent au contour de la vésicule et l'axe X. La flèche indique la direction du mouvement.*

### **III Bilan des forces sur une vésicule déformée par la comète d'actine.**

Pour déterminer la forme de la vésicule, il faut faire le bilan des forces qui s'appliquent en tout point à la membrane. Cette approche est semblable à celle développée par Boukellal et collaborateurs dans l'étude de la propulsion de gouttelettes d'huile (Boukellal et al. 2004). Cependant, ici, la répartition des forces est basée sur la distribution des molécules de N-WASP et d'actine à la surface des vésicules, mesurée expérimentalement.

Nous nous plaçons dans le référentiel de la vésicule, ce qui revient à considérer qu'elle est immobile et qu'elle est entourée d'un flux de fluide dont la direction est opposée à celle du mouvement.

Ces forces ont trois origines différentes :

- des forces hydrodynamiques dues au flux de fluide autour de la vésicule ;
- des forces de traction et de poussée exercées par le gel d'actine selon que les filaments soient attachés ou non à la vésicule ;
- la réponse de la membrane, qui tend à s'opposer aux déformations, de par sa rigidité de courbure et la tension de surface.

Ces forces peuvent être décomposées en des composantes normales et tangentielles.

Considérons d'abord le bilan des forces tangentielles. La composante tangentielle des flux hydrodynamiques dépend de la vitesse de la vésicule. Toutefois, comme la vitesse de la vésicule ( $v \sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$ ) est faible, la force visqueuse est inférieure au pN, donc négligeable. L'actine exerce également des forces tangentielles puisqu'elle induit la ségrégation de N-WASP. Toutefois, comme N-WASP est attaché à des lipides nickel dans une membrane fluide, on considère que la traction vers l'arrière des sites N-WASP liés se fait sans grande résistance. A l'échelle microscopique, les forces tangentielles dues à l'actine vont juste provoquer une réorganisation très rapide des lipides dans la membrane. Aux forces dues au flux et à l'actine vont s'opposer des forces dues aux gradients de tension de surface. Les premières étant faibles, les variations de  $\Sigma$  peuvent elles aussi être considérées comme négligeables. En première approximation, on a donc  $\Sigma = 0$  et  $v = 0$ .

Le bilan des forces peut donc être fait suivant la composante normale uniquement. Le contour des vésicules et les forces sont exprimés dans le système de coordonnées  $(s, \psi)$  plutôt que dans le système de coordonnées cartésiennes  $(Z, X)$  définis en Figure V-3 (Seifert et al. 1991). A l'équilibre, le bilan des forces en tout point de la surface s'écrit (Zhong-can and Helfrich 1989)

$$\bar{p} - 2\Sigma H + \kappa(2H - c_0) \left( 2H^2 - \frac{2}{c_1 c_2} - c_0 H \right) + 2\kappa \Delta H = 0$$

Où  $\bar{p}$  est la somme de la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule (due à la pression osmotique) et de la pression exercée par le gel d'actine ;

$\Sigma$  et  $\kappa$  sont la tension de surface et la rigidité de courbure de la membrane ;

$c_0$ ,  $c_1$  et  $c_2$  sont les courbures spontanée et principales, et  $H = \frac{1}{2}(c_1 + c_2)$  la courbure

moyenne de la membrane ;

Dans notre système de coordonnées, les courbures principales  $c_1$  et  $c_2$  s'écrivent

$$c_1(s) = \frac{\sin(\Psi(s))}{x(s)} \quad \text{et} \quad c_2(s) = \frac{\partial \Psi(s)}{\partial s}$$

$c_0$  correspond à une éventuelle asymétrie dans la composition lipidique des deux feuillets ou bien à la forme adoptée par la bicouche en l'absence de contrainte. On considère que les vésicules étudiées ne présentent pas de courbure spontanée.

D'après les mesures de fluctuations thermiques (cf. Partie I du chapitre),  $\Sigma$  étant supérieure à  $10^{-5}$  N/m et  $\kappa$  é

tant de l'ordre de  $10^{-20}$  J, la contribution de la rigidité de courbure est négligeable devant celle de la tension de surface.

Le bilan des forces en tout point  $s$  du contour peut, au final, être simplifié à :

$$\bar{p}(s) = -\Sigma \left( \frac{\sin(\Psi(s))}{x(s)} + \frac{\partial \Psi(s)}{\partial s} \right)$$

L'objectif est de vérifier qu'il est possible de prédire la forme de la vésicule en considérant que celle-ci est principalement déterminée par l'action antagoniste de deux populations de filaments d'actine : ceux qui ne sont pas liés à N-WASP et qui poussent contre la paroi de la vésicule ; ceux qui sont liés à N-WASP et qui tirent la vésicule vers l'arrière. Pour vérifier cette hypothèse, R. Gracia et R. Lipowsky proposent un modèle simple pour décrire la pression subie par la vésicule en fonction des densités d'actine et de N-WASP.

Nous supposons que, tout le long du contour, c'est la même fraction de sites N-WASP qui est liée à des filaments d'actine, alors la force de traction exercée par les filaments liés à N-WASP est directement proportionnelle à la densité de N-WASP  $f_{N-WASP}(s)$ . On considère également que la force de poussée est directement proportionnelle à la densité de filaments libres  $f_{Act}(s) - f_{N-WASP}(s)$ . Le terme de pression se décompose donc de la manière suivante :

$$\bar{p}(s) = p + a(f_{Act}(s) - f_{N-WASP}(s)) + bf_{N-WASP}(s)$$

Où  $p$  correspond à la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, qui rend compte du fait que le fluide est incompressible.

Au final, l'équation de Laplace s'écrit :

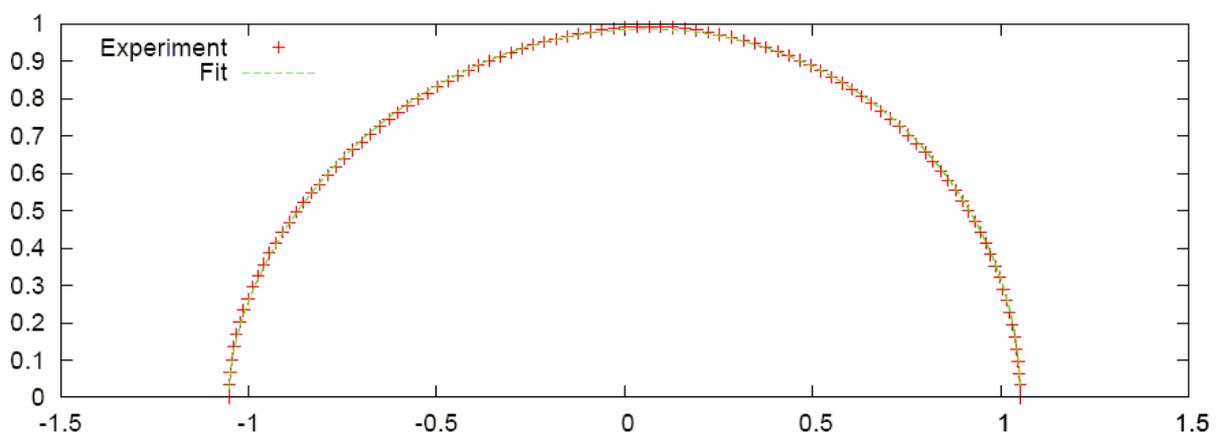
$$\Sigma \left( \frac{\sin(\Psi(s))}{x(s)} + \frac{\partial \Psi(s)}{\partial s} \right) = p + a(f_{Act}(s) - f_{N-WASP}(s)) + bf_{N-WASP}(s)$$

#### **IV Résolution de l'équation et détermination de la forme de la vésicule.**

Les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $p$  dans l'équation ne sont pas indépendants et sont déterminés en utilisant la méthode de « *shooting to a midpoint* » (Vetterling et al., 1997), qui consiste en deux étapes :

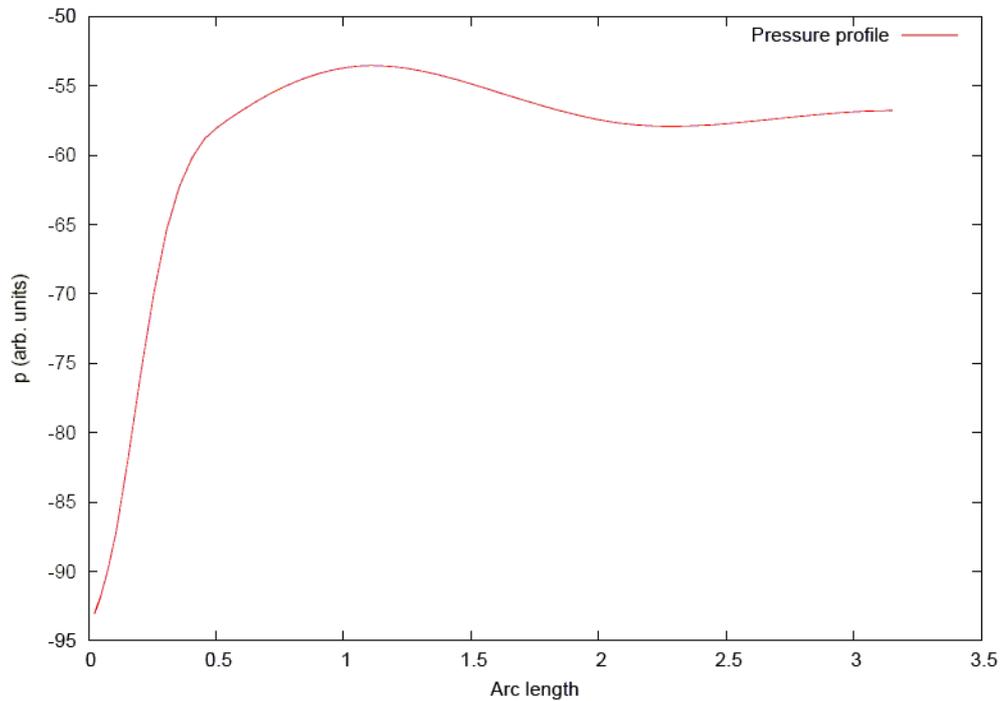
- 1) avec deux paramètres fixés, on trouve le troisième qui vérifie les conditions limites ;
- 2) ensuite on cherche les deux premiers pour lequel le contour calculé de la vésicule se rapproche du contour expérimental (Figure V-4).

Comme la tension de surface  $\Sigma$  n'est pas connue, les trois paramètres sont déterminés en fonction de  $\Sigma$  et sont donc exprimés en  $nN/\mu m^2$ , si  $s$  est exprimé en  $mN/m$ .

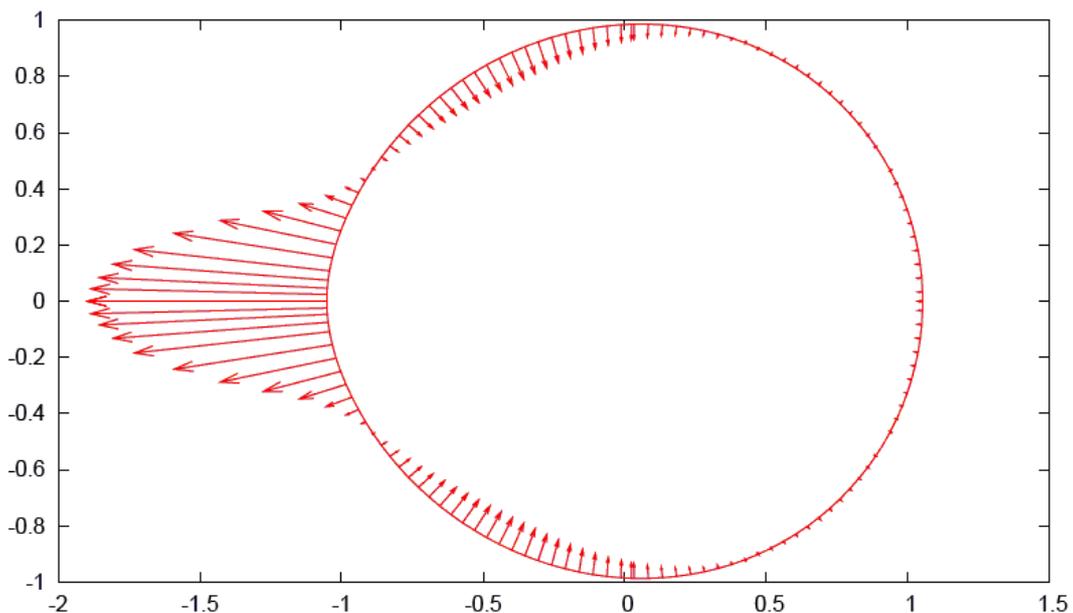


**Figure V-4 : Superposition des contours théorique (en vert) et expérimental (en rouge) de la vésicule montrée en Fig.2, dans le système de coordonnées (Z,X) normalisé par le rayon  $R_0$  d'une sphère de volume identique à celui de la vésicule. Les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $p$  utilisés pour superposer les contours sont :  $a = 0,19\Sigma$ ,  $b = -0,30\Sigma$ ,  $p = -0,45\Sigma$ .**

Une fois  $a$ ,  $b$  et  $p$  déterminés, on peut calculer le profil de la pression totale exercée en tout point de la membrane (Figure V-5), ainsi que la distribution des forces, en unités de  $\Sigma$ , sur la vésicule (Figure V-6).



**Figure V-5 : Distribution de la pression le long du contour de la vésicule montrée en Figure V-4.  $P$  est calculé avec les paramètres  $a$  ( $0,19\Sigma$ ),  $b$  ( $-0,30\Sigma$ ) et  $p$  ( $-0,45\Sigma$ ) définis à la Fig. V-4 et les profils de densités de N-WASP et d'actine mesurés et montrés en Fig. V-2.**



**Figure V-6 : Distribution des forces à la surface de la vésicule.**

Au vu des résultats ci-dessus, on peut interpréter le coefficient  $a$  comme représentant le terme de poussée par le gel d'actine alors que  $b$  correspond à un terme de traction par le gel. Dans l'équation finale des forces, le terme en  $a$  est attribué à l'action des filaments libres qui poussent contre la membrane, celui en  $b$  à l'action des filaments liés à N-WASP qui exercent une force de traction, en accord avec le modèle de « *tethered ratchet* » de Mogilner et Oster (Mogilner and Oster 2003).

Le modèle proposé ici ne permet pas de mesurer de manière quantitative la distribution des forces s'exerçant sur la vésicule car la tension de surface n'est pas connue. Il serait très profitable de pouvoir au moins estimer la tension de surface moyenne des vésicules étudiées et proposer un modèle convaincant permettant de tenir compte des gradients de tension de surface le long du contour de la vésicule. Selon toute vraisemblance, la tension de surface varie en fonction de la densité de N-WASP :  $\Sigma(s) = \Sigma + \alpha f_{N-WASP}(s)$ . Néanmoins, la détermination du coefficient  $\alpha$  n'est pas triviale.

Il semble également que les forces de traction soient supérieures aux forces de poussée (Figure V-6). Le modèle de poussée/traction par les filaments ne suffit donc pas à expliquer le mouvement. Le gel d'actine doit également emmagasiner des contraintes internes et exercer une force en retour pour compenser ces forces de traction importantes et que la vésicule soit poussée vers l'avant, en accord avec le modèle du gel élastique. C'est donc plutôt une combinaison des deux modèles qui permettrait de décrire le phénomène de propulsion basé sur la polymérisation d'actine.



# *Conclusions et perspectives*



## Conclusions.

L'analyse du mécanisme moléculaire qui sous-tend la motilité basée sur l'actine est rendue très complexe *in vivo* par le nombre important de facteurs de régulation, dont l'activité biologique est souvent redondante, et qui peuvent agir de manière non indépendante. L'utilisation d'un système reconstitué minimal *in vitro* prend tout son sens en permettant de ne faire intervenir que le strict minimum d'acteurs protéiques et de contrôler le maximum de paramètres, biochimiques ou physiques. Une telle approche a plusieurs objectifs : elle permet de tester les concepts fondamentaux utilisés par la cellule vivante pour engendrer la motilité, elle permet de démontrer le rôle des facteurs essentiels, redondants *in vivo* (comme les protéines de coiffe), enfin elle permet d'augmenter progressivement la complexité du système pour se rapprocher du contexte cellulaire, et de décrire les modes plus fins de régulation (par exemple le rôle de cappeurs faibles, ou de protéines qui comme la twinfiline combinent des activités biochimiques multiples). Le système de propulsion de billes solides fonctionnalisées a en ce sens fourni des informations mécanistiques importantes et a permis la mesure de force produite par polymérisation dirigée d'actine. L'utilisation de liposomes fonctionnalisés a permis d'analyser un paramètre important dans le mouvement cellulaire : le rôle de l'interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique. En effet, *in vivo* la dynamique de la membrane et du cytosquelette sont étroitement couplées du fait que les filaments sont initiés par une machinerie protéique associée à la membrane. Bien que les liposomes ne fournissent qu'une image simplifiée et imparfaite de la membrane biologique, ils permettent d'aborder de façon simple le rôle de deux paramètres dans la motilité : la fluidité de la membrane et sa déformabilité. L'étude de la propulsion de vésicules formées d'une bicouche lipidique (GUVs) placées dans le milieu de motilité minimum constitue un système biomimétique de choix. Nous avons pu, en agissant sur des variables physico-chimiques du milieu, reproduire des mouvements saltatoires observés de manière circonstancielle dans la propulsion de mutants de *Listeria*. L'analyse de ce mouvement a permis de mettre en évidence comment la mobilité des initiateurs des filaments dans l'environnement fluide de la bicouche lipidique facilite la polarisation de la vésicule et le maintien de la directionnalité du mouvement, fournissant ainsi une explication moléculaire d'une caractéristique essentielle du mouvement cellulaire et du chimiotactisme.

Un autre aspect important de notre travail a été de montrer comment une étude du mouvement à l'échelle mésoscopique pouvait mettre en lumière les mécanismes moléculaires responsables du mouvement. Nous avons ainsi montré que l'interaction entre les filaments et la machinerie N-WASP se fait par l'intermédiaire du complexe Arp2/3, et que la réaction de branchement, en établissant ce lien, participe à la ségrégation des molécules de N-WASP, initiateurs de filaments. J'ai montré que la balance entre mouvement saltatoire et mouvement continu dépend de la capacité des vésicules à maintenir la ségrégation des activateurs établie lors de l'initiation du mouvement. Le comportement motile des vésicules est contrôlé par un mécanisme de ségrégation-diffusion qui dépend de la concentration de complexe Arp2/3. Ces résultats vont dans le sens du modèle de *tethered ratchet*, et montrent que la proportion de filaments attachés et détachés est doublement contrôlée par la réaction de branchement – donc par Arp2/3 – et par la mobilité de N-WASP à la surface du liposome.

Ces résultats ont été confortés par l'étude du mouvement de vésicules fonctionnalisées avec le fragment VC de N-WASP, qui a une activité de branchement très affaiblie, mais fixe l'actine G comme N-WASP (ou comme VCA) par son domaine WH2. Les vésicules VC montrent alors une densité de branchement de la comète trois fois plus faible et une vitesse de propulsion deux fois plus grande que les vésicules fonctionnalisées par VCA. La proportion plus faible de filaments attachés explique pourquoi le mouvement est plus rapide. La morphologie des comètes est également affectée : le centre de la comète présente une surdensité d'actine au sein de laquelle la densité de branchement est deux fois plus faible qu'à la périphérie. Le gel étant plus lâche que celui engendré par VCA, il s'ouvre plus facilement et la croissance d'un gel d'actine à l'avant de la vésicule n'engendre pas l'arrêt de la vésicule : on n'observe pas de mouvement saltatoire semblable à celui observé avec N-WASP et VCA, et les vésicules ne sont pas déformées pendant le mouvement.

Le modèle de ségrégation-diffusion est conforté par des calculs théoriques qui prédisent la distribution des activateurs en considérant deux populations de sites N-WASP : ceux qui sont liés à un filament d'actine par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 et ceux qui sont libres de diffuser à la surface de la vésicule. Le cas des vésicules VC peut être vu comme une situation où la constante d'association activateur-filament  $k_b$  est plus faible qu'avec N-WASP.

Le rôle de l'interaction dynamique des filaments avec N-WASP-Arp2/3 dans le mouvement a été approfondi en fonctionnalisant des liposomes avec le fragment VCA dont le domaine WH2 est couplé covalamment à la molécule de G-actine qui est nécessaire au branchement. Ce complexe covalent possède une activité de brachement de filaments inaltérée en solution, mais une fois immobilisé à la surface du liposome, même en faible proportion par rapport à VCA, il engendre une forte inhibition du mouvement. Nous proposons que l'attachement permanent des filaments à VCA-actine, une fois la molécule d'actine incorporée dans la jonction branchée, est responsable de cette inhibition. Le mouvement requiert la dissociation de la jonction branchée de VCA. Là encore ce travail éclaire le rôle des étapes élémentaires du processus de branchement dans la motilité à l'échelle mésoscopique

Enfin, les études réalisées en collaboration avec Ruben Gracia, dans le groupe de théoriciens dirigé par Reinhard Lipowsky au Max Planck Institute of Colloids and Interfaces de Golm ont montré que la forme adoptée par la vésicule en régime de propulsion continue peut être prédite à partir des paramètres physiques des vésicules et des profils de densité de l'actine et de N-WASP. Cette approche est entièrement nouvelle car, la distribution des pressions s'exerçant sur la vésicule est habituellement déterminée à partir de la forme de la vésicule. Les résultats obtenus confortent le modèle selon lequel il existe deux populations de filaments d'actine:

- les filaments liés à N-WASP par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 et qui freinent le mouvement de propulsion en exerçant des forces de traction
- les filaments qui poussent contre la membrane et participent au mouvement.

Le fait que la densité de N-WASP soit la seule variable à considérer pour rendre compte des forces de traction et prédire la forme exacte de la vésicule prouve que l'attachement se fait bien par l'intermédiaire de N-WASP.



## *Perspectives.*

### *1) Mesures de la dynamique de N-WASP en interaction avec la membrane et les filaments par FRAP & FLIP*

Le modèle de ségrégation - diffusion des activateurs et d'attachement transitoire des filaments à N-WASP par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 permet d'expliquer efficacement le mouvement saltatoire. Les calculs théoriques réalisés permettent de retrouver les profils de N-WASP mesurés sur des vésicules en mouvement continu, cependant la preuve expérimentale directe que ce mécanisme soit effectivement à l'œuvre dans ce cas n'a pas été obtenue. En effet, dans le cas du mouvement continu, les distributions d'actine et de N-WASP sont semblables au cours du temps, nous n'avons pas de preuve directe de l'existence de deux populations de filaments.

Des expériences de photo-blanchiment de N-WASP marqué par un fluorophore extrinsèque semblent indiquées pour apporter une preuve expérimentale témoignant qu'il existe bien deux populations de sites N-WASP, lié et non lié aux filaments. Deux types d'expériences sont envisageables :

1) On peut blanchir ponctuellement la partie arrière de la vésicule en contact avec la comète d'actine (FRAP) et observer le retour de la fluorescence à cet endroit. Les sites N-WASP libres doivent en effet diffuser rapidement. Les sites N-WASP liés aux filaments par l'intermédiaire d'Arp2/3 doivent d'abord se détacher avant de pouvoir participer au retour de fluorescence, qui doit donc s'effectuer en deux phases : une rapide et une plus lente.

2) On peut aussi blanchir l'avant de la vésicule en continu et étudier la cinétique de perte de fluorescence (FLIP). Là encore, on doit observer une évolution biphasique traduisant la différence de mobilité des deux populations de sites N-WASP.

Jusqu'à présent, cette expérience a été empêchée par l'inactivation de N-WASP fluorescent par la lumière. La recherche de fluorophores plus adaptés et le marquage de résidus de N-WASP évitant ces problèmes est en cours.

## **2) Mesure des constantes de temps d'attachement N-WASP-Arp2/3 et N-WASP-Arp2/3-filament**

Pour aller plus loin dans l'analyse du mécanisme d'interaction activateur-filament, il serait intéressant de mesurer les constantes de vitesse associées à chacune des étapes conduisant à l'attachement d'un filament (constantes de temps  $k_1$  et  $k_2$  illustrées figure IV-21). La détermination de  $k_2$  peut être réalisée en microscopie de fluorescence à onde évanescente (TIRF) en mesurant le temps moyen d'attachement d'un filament unique au complexe N-WASP-Arp2/3 immobilisé à la surface d'une lame de verre.

## **3) Mesures du turnover de différentes protéines impliquées dans le mouvement.**

La qFSM (« *quantitative Fluorescent Speckle Microscopy* ») a été jusqu'à présent utilisée pour mesurer le turnover de l'actine (Waterman Storer et al. ), de la gelsoline (Watanabe et al. ,2002) et de l'ADF in vivo dans le lamellipode. Cette technique pourrait être utilisée dans le système biomimétique de la même manière pour suivre les molécules individuelles dans la comète au cours du mouvement.

## **4) Reconstitution de la protrusion.**

La propulsion de vésicules permet d'étudier de manière simple le rôle de la mobilité des activateurs et la déformabilité de la membrane. Toute fois, dans les cellules, la courbure de la membrane est inversée et la polymérisation d'actine génère une force de protrusion et non pas de propulsion. Afin de véritablement mimer la protrusion du lamellipode, il faudrait que la polymérisation de l'actine ait lieu à la face concave donc interne des vésicules. Plusieurs travaux ont permis d'observer des protrusions membranaires par encapsulation d'actine à une concentration d'au moins 50 $\mu$ M.

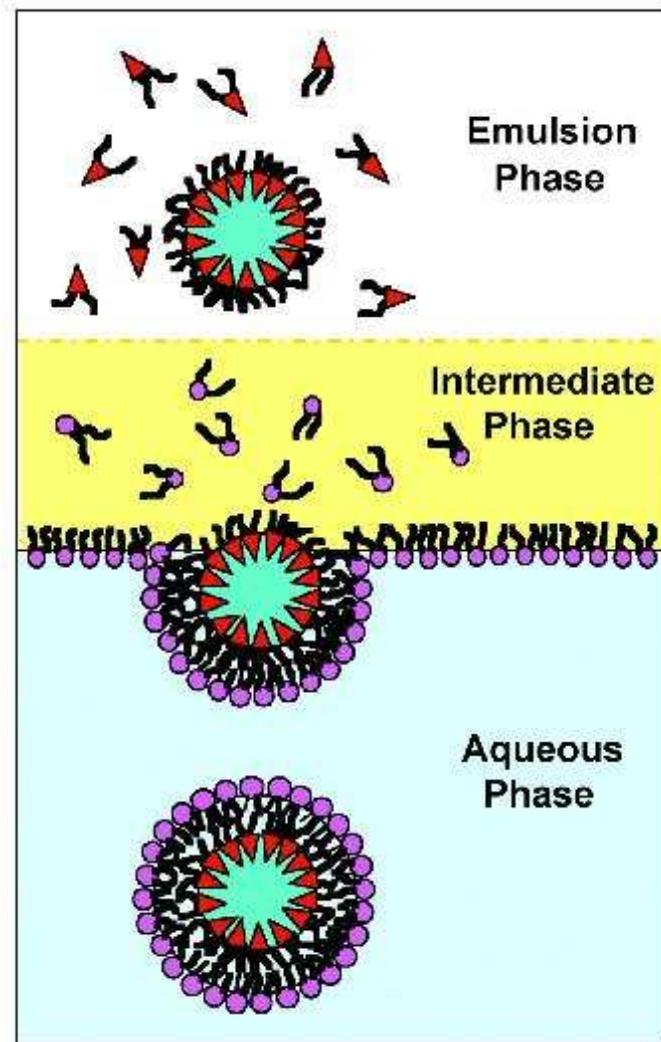
La densité d'actine dans le lamellipode et dans la comète propulsant des objets artificiels est de l'ordre du millimolaire (Wiesner et al, 2003, Abraham et al. 1999). Un rapide calcul montre qu'une vésicule de 10 $\mu$ m de diamètre encapsulant 100 $\mu$ M d'actine contient simplement la quantité d'actine nécessaire à la formation d'une couronne de gel sphérique de 0,3 $\mu$ m d'épaisseur. Ainsi, le recyclage par dépolymérisation du réseau déjà polymérisé et la création de nouveaux bouts barbés apparaissent essentiels pour l'activité

protrusive dans un tel système. Or, dans toutes les expériences publiées, l'actine n'a été encapsulée qu'en compagnie de gelsoline et de différents agents de pontage mais sans le complexe Arp2/3 ni les protéines accélérant le treadmilling comme la profiline et l'ADF, dont le rôle est de tamponner le milieu en actine-G libre.

En outre, ces systèmes ne contiennent pas d'activateurs initiant spécifiquement la polymérisation à la membrane comme c'est le cas *in vivo* : il apparaît évident qu'un système artificiel mimant efficacement la protrusion du lamellipode doit inclure non seulement les protéines accélérant le treadmilling de l'actine mais aussi les activateurs initiant la polymérisation directement au niveau de la membrane. L'encapsulation des protéines initiant la nucléation de filaments et régulant le treadmilling pose un certain nombre de problèmes techniques à résoudre.

Dans un premier temps, nous avons pu encapsuler de l'actine fluorescente sous forme monomérique ou filamenteuse en fabriquant des mini-filaments dont la taille est contrôlée en ajoutant de la gelsoline. Après le gonflement, le milieu encapsulé est identique au milieu externe : nous avons lavé ce dernier en faisant circuler lentement un flux de tampon d'osmolarité égale à celle du milieu encapsulé mais dépourvu de protéines. Nous avons également éliminé le milieu extérieur au moyen de deux cycles de dilution/sédimentation après le gonflement, réalisés en transférant les liposomes dans une cellule de sédimentation contenant un milieu isotonique de plus faible densité que le milieu encapsulé. Les vésicules sédimentent alors et se trouvent lavées et concentrées au fond de la cellule. L'encapsulation d'actine fluorescente nous a permis de contrôler que l'actine était bien encapsulée et que la vésicule ne fuyait pas au cours du lavage. Nos résultats ont confirmé ceux publiés dans la littérature : les rendements d'encapsulation sont faibles.

Il faut donc s'orienter vers une autre technique permettant d'encapsuler l'intégralité du milieu de motilité. Une approche intéressante proposée par Pautot et collaborateurs (Pautot et al PNAS 2003) consiste à faire sédimenter des vésicules unilamellaires à travers une monocouche de lipides. L'encapsulation du milieu de motilité dans les vésicules est effectuée en réalisant une émulsion : le milieu de motilité est placé dans un solvant organique contenant des lipides venant d'adsorber à l'interface entre le milieu aqueux et le solvant (figure 1)



**Figure D1: Encapsulation du milieu de motilité dans des bicouches lipidiques.**

*Une émulsion est réalisée en plaçant le milieu de motilité (en bleu cyan) dans un solvant organique saturé en lipides (en rouge) qui viennent s'adsorber à l'interface entre le milieu aqueux et le solvant. Les vésicules unilamellaires ainsi formées sédimentent à travers une phase contenant les lipides au nickel (en violet), qui se retrouvent dans la couche externe de vésicules. D'après(Pautot et al. 2003).*

Une fois que nous aurons réussi à encapsuler le milieu de motilité complet et à induire la polymérisation d'actine à l'intérieur des vésicules pour observer des protrusions membranaires, le but à plus long terme est de coordonner la protrusion et l'adhésion d'un liposome capable de se déplacer via des intégrines sur une surface recouverte de fibronectine, mimant ainsi idéalement la migration des cellules.





# *Références bibliographiques*

- Abdul-Manan N, Aghazadeh B, Liu GA, Majumdar A, Ouerfelli O et al. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature* 399(6734): 379-383.
- Abraham VC, Krishnamurthi V, Taylor DL, Lanni F (1999) The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys J* 77(3): 1721-1732.
- Akashi K, Miyata H, Itoh H, Kinoshita K, Jr. (1998) Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophys J* 74(6): 2973-2982.
- Akutsu H, Seelig J (1981) Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* 20(26): 7366-7373.
- Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE (2005) Lipid diffusion, free area, and molecular dynamics simulations. *Biophys J* 88(6): 4434-4438.
- Amann KJ, Pollard TD (2001) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3(3): 306-310.
- Amann KJ, Pollard TD (2001) Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15009-15013.
- Angelova M, Dimitrov, D. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* 81: 303-311.
- Angelova MI, S. Soléau, Ph. Méléard, J. F. Faucon, and P. Bothorel. (1992) Preparation of giant vesicles by external AC electric fields: Kinetics and applications. *Progr Colloid Polym Sci*(89): 127-131.
- Bacia K, Scherfeld D, Kahya N, Schwille P (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J* 87(2): 1034-1043.
- Bagatolli LA, Gratton E (2000) Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys J* 78(1): 290-305.
- Balasubramanian MK, Hirani BR, Burke JD, Gould KL (1994) The *Schizosaccharomyces pombe cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 125(6): 1289-1301.
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425(6960): 821-824.
- Bearer EL, Satpute-Krishnan P (2002) The role of the cytoskeleton in the life cycle of viruses and intracellular bacteria: tracks, motors, and polymerization machines. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2(3): 247-264.
- Benesch S, Lommel S, Steffen A, Stradal TE, Scaplehorn N et al. (2002) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem* 277(40): 37771-37776.
- Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ (1989) Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10): 3867-3871.
- Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Simonsen AC, Bagatolli LA (2004) Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J Biol Chem* 279(39): 40715-40722.
- Bernheim-Groswasser A, Prost J, Sykes C (2005) Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram. *Biophys J* 89(2): 1411-1419.
- Bernheim-Groswasser A, Wiesner S, Golsteyn RM, Carlier M-F, Sykes C (2002) The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417(6886): 308-311.

- Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA et al. (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404(6781): 1007-1011.
- Boroske E, Elwenspoek M, Helfrich W (1981) Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys J* 34(1): 95-109.
- Boukellal H, Campas O, Joanny JF, Prost J, Sykes C (2004) Soft *Listeria*: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 69(6 Pt 1): 061906.
- Bray D, Thomas C (1976) Unpolymerized actin in fibroblasts and brain. *J Mol Biol* 105(4): 527-544.
- Cameron LA, Footer MJ, van Oudenaarden A, Theriot JA (1999) Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *PNAS* 96(9): 4908-4913.
- Cameron LA, Svitkina TM, Vignjevic D, Theriot JA, Borisy GG (2001) Dendritic organization of actin comet tails. *Current Biology* 11(2): 130-135.
- Canham PB (1970) The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J Theor Biol* 26(1): 61-81.
- Carlier MF, Pantaloni D (1986) Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* 25(24): 7789-7792.
- Carlier MF, Pantaloni D, Korn ED (1986) Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin. *J Biol Chem* 261(23): 10778-10784.
- Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D (1999) Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem* 274(48): 33827-33830.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D et al. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136(6): 1307-1322.
- Carlier MF, Nioche P, Broutin-L'Hermite I, Boujemaa R, Le Clainche C et al. (2000) GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* 275(29): 21946-21952.
- Carlsson AE (2001) Growth of Branched Actin Networks against Obstacles. *Biophys J* 81(4): 1907-1923.
- Carlsson AE (2003) Growth Velocities of Branched Actin Networks. *Biophys J* 84(5): 2907-2918.
- Carlsson AE, Wear MA, Cooper JA (2004) End versus side branching by Arp2/3 complex. *Biophys J* 86(2): 1074-1081.
- Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE (2003) Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 307(2): 355-361.
- Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M (2002) Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(3): 220-228.
- Co C, Wong DT, Gierke S, Chang V, Taunton J (2007) Mechanism of actin network attachment to moving membranes: barbed end capture by N-WASP WH2 domains. *Cell* 128(5): 901-913.
- Cooper JA, Buhle EL, Jr., Walker SB, Tsong TY, Pollard TD (1983) Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 22(9): 2193-2202.
- Cortese JD, Schwab B, 3rd, Frieden C, Elson EL (1989) Actin polymerization induces a shape change in actin-containing vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15): 5773-5777.

- Coue M, Korn ED (1985) Interaction of plasma gelsolin with G-actin and F-actin in the presence and absence of calcium ions. *J Biol Chem* 260(28): 15033-15041.
- Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M (1995) Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378(6557): 636-638.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 79(5): following 922.
- Dickinson RB, Purich DL (2002) Clamped-Filament Elongation Model for Actin-Based Motors. *Biophys J* 82(2): 605-617.
- Didry D, Carlier MF, Pantaloni D (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem* 273(40): 25602-25611.
- Didry N, Seidel V, Dubreuil L, Tillequin F, Bailleul F (1999) Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *J Ethnopharmacol* 67(2): 197-202.
- Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* 82(1 Pt 1): 274-284.
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M et al. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80(3): 1417-1428.
- Dimitrov DS, Jain RK (1984) Membrane stability. *Biochim Biophys Acta* 779(4): 437-468.
- Dimova R, Pouligny B, Dietrich C (2000) Pretransitional effects in dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study. *Biophys J* 79(1): 340-356.
- Dobereiner HG, Gompper G, Haluska CK, Kroll DM, Petrov PG et al. (2003) Advanced flicker spectroscopy of fluid membranes. *Phys Rev Lett* 91(4): 048301.
- Dustin ML, Cooper JA (2000) The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1(1): 23-29.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418(6899): 790-793.
- Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D et al. (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146(6): 1319-1332.
- Evans EA (1973) New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys J* 13(9): 941-954.
- Frischknecht F, Moreau V, Rottger S, Gonfloni S, Reckmann I et al. (1999) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401(6756): 926-929.
- Gazeau F, Heegaard BM, Bacri J, Cebers A, Perzynski R (1996) Magnetic fluid under vorticity: Free precession decay of magnetization and optical anisotropy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 54(4): 3672-3675.
- Gerbal F, Chaikin P, Rabin Y, Prost J (2000) An Elastic Analysis of *Listeria monocytogenes* Propulsion. *Biophys J* 79(5): 2259-2275.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A et al. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161(6): 1163-1177.
- Giardini PA, Fletcher DA, Theriot JA (2003) Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6493-6498.

- Goldberg DJ, Foley MS, Tang D, Grabham PW (2000) Recruitment of the Arp2/3 complex and mena for the stimulation of actin polymerization in growth cones by nerve growth factor. *J Neurosci Res* 60(4): 458-467.
- Goldberg MB, Theriot JA (1995) *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6572-6576.
- Goley ED, Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(10): 713-726.
- Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H et al. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* 112 (Pt 11): 1697-1708.
- Gournier H, Goley ED, Niederstrasser H, Trinh T, Welch MD (2001) Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell* 8(5): 1041-1052.
- Grimm R, Barmann M, Hackl W, Typke D, Sackmann E et al. (1997) Energy filtered electron tomography of ice-embedded actin and vesicles. *Biophys J* 72(1): 482-489.
- Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M (1994) *Dictyostelium amoebae* that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell* 79(2): 303-314.
- Heinzen RA, Grieshaber SS, Van Kirk LS, Devin CJ (1999) Dynamics of actin-based movement by *Rickettsia rickettsii* in *vero* cells. *Infect Immun* 67(8): 4201-4207.
- Helfer E, Harlepp S, Bourdieu L, Robert J, MacKintosh FC et al. (2001) Buckling of actin-coated membranes under application of a local force. *Phys Rev Lett* 87(8): 088103.
- Helfrich W (1973) Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]* 28(11): 693-703.
- Higgs HN, Pollard TD (1999) Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem* 274(46): 32531-32534.
- Hill TL (1981) Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5613-5617.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* 347(6288): 44-49.
- Honda M, Takiguchi K, Ishikawa S, Hotani H (1999) Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. *J Mol Biol* 287(2): 293-300.
- Houchmandzadeh B, Marko JF, Chatenay D, Libchaber A (1997) Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol* 139(1): 1-12.
- Hudson AM, Cooley L (2002) Understanding the function of actin-binding proteins through genetic analysis of *Drosophila oogenesis*. *Annu Rev Genet* 36: 455-488.
- Hug C, Jay PY, Reddy I, McNally JG, Bridgman PC et al. (1995) Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in *dictyostelium*. *Cell* 81(4): 591-600.
- Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J (2002) Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 12(1): 79-84.
- Isambert H, Venier P, Maggs AC, Fattoum A, Kassab R et al. (1995) Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* 270(19): 11437-11444.
- Israelachvili J (1992) *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, 2ème édition.
- Jacobson K, Sheets ED, Simson R (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268(5216): 1441-1442.

- Jansen M, Blume A (1995) A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. *Biophys J* 68(3): 997-1008.
- Julicher F, Lipowsky R (1993) Domain-induced budding of vesicles. *Phys Rev Lett* 70(19): 2964-2967.
- Julicher F, Lipowsky R (1996) Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 53(3): 2670-2683.
- Kahya N, Pecheur EI, de Boeij WP, Wiersma DA, Hoekstra D (2001) Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys J* 81(3): 1464-1474.
- Kelly AE, Kranitz H, Dotsch V, Mullins RD (2006) Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* 281(15): 10589-10597.
- Kessels MM, Qualmann B (2002) Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *Embo J* 21(22): 6083-6094.
- Kocks C, Marchand JB, Gouin E, d'Hauteville H, Sansonetti PJ et al. (1995) The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol* 18(3): 413-423.
- Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238(4827): 638-644.
- Kudryashov DS, Sawaya MR, Adisetiyo H, Norcross T, Hegyi G et al. (2005) The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37): 13105-13110.
- Kummrow M, Helfrich W (1991) Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys Rev A* 44(12): 8356-8360.
- Kuo SC, McGrath JL (2000) Steps and fluctuations of *Listeria monocytogenes* during actin-based motility. *Nature* 407(6807): 1026-1029.
- Kwok R, Evans E (1981) Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys J* 35(3): 637-652.
- Lasa I, Gouin E, Goethals M, Vancompernelle K, David V et al. (1997) Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *Embo J* 16(7): 1531-1540.
- Lasic DD, Papahadjopoulos D (1995) Liposomes revisited. *Science* 267(5202): 1275-1276.
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L et al. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144(6): 1245-1258.
- Le Clainche C, Pantaloni D, Carlier MF (2003) ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6337-6342.
- Lenne PF, Wawrezynieck L, Conchonaud F, Wurtz O, Boned A et al. (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *Embo J* 25(14): 3245-3256.
- Limozin L, Sackmann E (2002) Polymorphism of cross-linked actin networks in giant vesicles. *Phys Rev Lett* 89(16): 168103.
- Limozin L, Barmann M, Sackmann E (2003) On the organization of self-assembled actin networks in giant vesicles. *Eur Phys J E Soft Matter* 10(4): 319-330.
- Lipowsky R (1995) The morphology of lipid membranes. *Curr Opin Struct Biol* 5(4): 531-540.

- Lipowsky R, Sackmann, E. (1995) *From Cells to Vesicles. volume 1A of Structure and dynamics of membranes.*
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401(6753): 613-616.
- Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ (2000) Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* 95(9): 2943-2946.
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127(1): 107-115.
- Machesky LM, Reeves E, Wientjes F, Mattheyse FJ, Grogan A et al. (1997) Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J* 328 (Pt 1): 105-112.
- Madania A, Dumoulin P, Grava S, Kitamoto H, Scharer-Brodbeck C et al. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein *Las17p* interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell* 10(10): 3521-3538.
- Mahaffy RE, Pollard TD (2006) Kinetics of the formation and dissociation of actin filament branches mediated by Arp2/3 complex. *Biophys J* 91(9): 3519-3528.
- Makino K, Yamada T, Kimura M, Oka T, Ohshima H et al. (1991) Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chem* 41(2): 175-183.
- Marchand JB, Moreau P, Paoletti A, Cossart P, Carlier MF et al. (1995) Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. *J Cell Biol* 130(2): 331-343.
- Marcy Y, Prost J, Carlier M-F, Sykes C (2004) Forces generated during actin-based propulsion: A direct measurement by micromanipulation. *PNAS* 101(16): 5992-5997.
- Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* 25(15): 3446-3457.
- Marra J, Israelachvili J (1985) Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry* 24(17): 4608-4618.
- Mathivet L, Cribier S, Devaux PF (1996) Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J* 70(3): 1112-1121.
- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* 2(4): 246-248.
- McGough A, Chiu W (1999) ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *J Mol Biol* 291(3): 513-519.
- McGrath JL, Eungdamrong NJ, Fisher CI, Peng F, Mahadevan L et al. (2003) The force-velocity relationship for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol* 13(4): 329-332.
- Meleard P, Gerbeaud C, Bardusco P, Jeandaine N, Mitov MD et al. (1998) Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie* 80(5-6): 401-413.
- Meleard P, Gerbeaud C, Pott T, Fernandez-Puente L, Bivas I et al. (1997) Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. *Biophys J* 72(6): 2616-2629.
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G et al. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* 1(1): 72-74.

- Miki H, Suetsugu S, Takenawa T (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17(23): 6932-6941.
- Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391(6662): 93-96.
- Milligan RA, Whittaker M, Safer D (1990) Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348(6298): 217-221.
- Miyata H, Nishiyama S, Akashi K, Kinoshita K, Jr. (1999) Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2048-2053.
- Mockrin SC, Korn ED (1980) Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 19(23): 5359-5362.
- Mogilner A, Oster G (2003) Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J* 84(3): 1591-1605.
- Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G et al. (2000) A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol* 2(7): 441-448.
- Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai RS, Ike H et al. (2006) Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol* 174(6): 851-862.
- Mounier J, Ryter A, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun* 58(4): 1048-1058.
- Mullins RD, Pollard TD (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* 9(2): 244-249.
- Nakagawa H, Miki H, Ito M, Ohashi K, Takenawa T et al. (2001) N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci* 114(Pt 8): 1555-1565.
- Noireaux V, Golsteyn RM, Friederich E, Prost J, Antony C et al. (2000) Growing an Actin Gel on Spherical Surfaces. *Biophys J* 78(3): 1643-1654.
- Nolen BJ, Littlefield RS, Pollard TD (2004) Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound ATP or ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15627-15632.
- Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 41(1): 66-97.
- Olazabal IM, Machesky LM (2001) Abp1p and cortactin, new "hand-holds" for actin. *J Cell Biol* 154(4): 679-682.
- Olbrich K, Rawicz W, Needham D, Evans E (2000) Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J* 79(1): 321-327.
- Oosawa F, Kasai M (1962) A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J Mol Biol* 4: 10-21.
- Pantaloni D, Carlier MF (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75(5): 1007-1014.
- Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P, Carlier MF (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* 2(7): 385-391.
- Pautot S, Frisken BJ, Weitz DA (2003) Engineering asymmetric vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10718-10721.
- Pecreaux J, Dobreiner HG, Prost J, Joanny JF, Bassereau P (2004) Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur Phys J E Soft Matter* 13(3): 277-290.

- Perelroizen I, Carlier MF, Pantaloni D (1995) Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem* 270(4): 1501-1508.
- Peskin CS, Odell GM, Oster GF (1993) Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J* 65(1): 316-324.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576.
- Pruyne D, Bretscher A (2000) Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4): 571-585.
- Rafelski SM, Theriot JA (2004) Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73: 209-239.
- Ressad F, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier MF (1999) Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. *J Biol Chem* 274(30): 20970-20976.
- Ressad F, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH et al. (1998) Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J Biol Chem* 273(33): 20894-20902.
- Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH, Robbins KC (1995) Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 15(10): 5725-5731.
- Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN et al. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294(5547): 1679-1684.
- Rogers SL, Wiedemann U, Stuurman N, Vale RD (2003) Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* 162(6): 1079-1088.
- Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150(6): 1299-1310.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T et al. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97(2): 221-231.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P et al. (2005) Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *Embo J* 24(8): 1537-1545.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH et al. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 10(6): 311-320.
- Sablin EP, Dawson JF, VanLoock MS, Spudich JA, Egelman EH et al. (2002) How does ATP hydrolysis control actin's associations? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 10945-10947.
- Samarin S, Romero S, Kocks C, Didry D, Pantaloni D et al. (2003) How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol* 163(1): 131-142.
- Sandre O, Menager C, Prost J, Cabuil V, Bacri JC et al. (2000) Shape transitions of giant liposomes induced by an anisotropic spontaneous curvature. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62(3 Pt B): 3865-3870.
- Sawa M, Suetsugu S, Sugimoto A, Miki H, Yamamoto M et al. (2003) Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J Cell Sci* 116(Pt 8): 1505-1518.
- Schneider MB, Jenkins JT, Webb WW (1984) Thermal fluctuations of large cylindrical phospholipid vesicles. *Biophys J* 45(5): 891-899.
- Seifert K, Fendler K, Bamberg E (1993) Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys J* 64(2): 384-391.

- Seifert U, Berndl K, Lipowsky R (1991) Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models. *Phys Rev A* 44(2): 1182-1202.
- Sheets ED, Lee GM, Simson R, Jacobson K (1997) Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry* 36(41): 12449-12458.
- Sheetz MP, Turney S, Qian H, Elson EL (1989) Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature* 340(6231): 284-288.
- Shimshick EJ, Kleemann W, Hubbell WL, McConnell HM (1973) Lateral phase separations in membranes. *J Supramol Struct* 1(4): 285-294.
- Silvius JR (2003) Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. *Biophys J* 85(2): 1034-1045.
- Simson R, Sheets ED, Jacobson K (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J* 69(3): 989-993.
- Smith GA, Theriot JA, Portnoy DA (1996) The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J Cell Biol* 135(3): 647-660.
- Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16(7): 465-472.
- Southwick FS, Li W, Zhang F, Zeile WL, Purich DL (2003) Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil Cytoskeleton* 54(1): 41-55.
- Spudich JA, Watt S (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* 246(15): 4866-4871.
- Steinmetz MO, Goldie KN, Aebi U (1997) A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J Cell Biol* 138(3): 559-574.
- Subczynski WK, Wisniewska A, Hyde JS, Kusumi A (2007) Three-Dimensional Dynamic Structure of the Liquid-Ordered Domain in Lipid Membranes as Examined by Pulse-EPR Oxygen Probing. *Biophys J* 92(5): 1573-1584.
- Sun H, Lin K, Yin HL (1997) Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol* 138(4): 811-820.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL (1999) Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 274(47): 33179-33182.
- Suzuki T, Miki H, Takenawa T, Sasakawa C (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*. *Embo J* 17(10): 2767-2776.
- Svitkina TM, Borisy GG (1999) Progress in protrusion: the tell-tale scar. *Trends Biochem Sci* 24(11): 432-436.
- Svitkina TM, Borisy GG (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* 145(5): 1009-1026.
- Takenawa T, Miki H (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114(Pt 10): 1801-1809.
- Taunton J (2001) Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 13(1): 85-91.

- Taunton J, Rowning BA, Coughlin ML, Wu M, Moon RT et al. (2000) Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* 148(3): 519-530.
- Theriot JA, Mitchison TJ, Tilney LG, Portnoy DA (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357(6375): 257-260.
- Theriot JA, Rosenblatt J, Portnoy DA, Goldschmidt-Clermont PJ, Mitchison TJ (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76(3): 505-517.
- Tilney LG, Portnoy DA (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109(4 Pt 1): 1597-1608.
- Tilney LG, DeRosier DJ, Weber A, Tilney MS (1992) How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly, and evidence for a pointed end capper. *J Cell Biol* 118(1): 83-93.
- Tomasevic N, Jia Z, Russell A, Fujii T, Hartman JJ et al. (2007) Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* 46(11): 3494-3502.
- Trichet L, Campas O, Sykes C, Plastino J (2007) VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys J* 92(3): 1081-1089.
- Upadhyaya A, Chabot JR, Andreeva A, Samadani A, van Oudenaarden A (2003) Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4521-4526.
- van der Gucht J, Paluch E, Plastino J, Sykes C (2005) Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(22): 7847-7852.
- van Oudenaarden A, Theriot JA (1999) Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nature Cell Biology* 1(8): 493.
- Veatch SL, Keller SL (2002) Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys Rev Lett* 89(26): 268101.
- Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T et al. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8053-8058.
- Verheyen EM, Cooley L (1994) Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120(4): 717-728.
- Wang YL (1984) Reorganization of actin filament bundles in living fibroblasts. *J Cell Biol* 99(4 Pt 1): 1478-1485.
- Wang YL (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* 101(2): 597-602.
- Waterman-Storer CM, Danuser G (2002) New directions for fluorescent speckle microscopy. *Curr Biol* 12(18): R633-640.
- Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385(6613): 265-269.
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol* 138(2): 375-384.
- Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281(5373): 105-108.

- Wenger J, Conchonaud F, Dintinger J, Wawrezynieck L, Ebbesen TW et al. (2007) Diffusion analysis within single nanometric apertures reveals the ultrafine cell membrane organization. *Biophys J* 92(3): 913-919.
- Wiesner S, Helfer E, Didry D, Ducouret G, Lafuma F et al. (2003) A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol* 160(3): 387-398.
- Winter DC, Choe EY, Li R (1999) Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the *in vivo* and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7288-7293.
- Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ (2001) Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 3832-3836.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80(8 Suppl): 1529-1537.
- Yeagle PL (1985) Lanosterol and cholesterol have different effects on phospholipid acyl chain ordering. *Biochim Biophys Acta* 815(1): 33-36.
- Zhong-can OY, Helfrich W (1989) Bending energy of vesicle membranes: General expressions for the first, second, and third variation of the shape energy and applications to spheres and cylinders. *Phys Rev A* 39(10): 5280-5288.

# *Articles*



*Article 1:*  
*New journal of Physics*  
*(Sous presse)*



## **Actin-based propulsion of functionalized hard versus fluid spherical objects**

Vincent Delatour, Shashank Shekhar, Anne-Cécile Reymann, Dominique Didry, Kim Ho Diêp Lê, Guillaume Romet-Lemonne\*, Emmanuèle Helfer\*, Marie-France Carlier

Cytoskeleton Dynamics and Motility, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

\*corresponding authors : [romet@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:romet@lebs.cnrs-gif.fr), [helfer@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:helfer@lebs.cnrs-gif.fr)

### **Abstract**

The directed polymerization of a branched actin network against a functionalized surface drives cell protrusions and organelle propulsion in living cells. Solid microspheres or giant unilamellar vesicles, functionalized with N-WASP, initiate the formation of a branched actin array using Arp2/3 complex, when placed in a motility assay reconstituted with pure proteins. These systems are useful biomimetic models of actin-based propulsion that allow to address how the interplay between the physical properties of the functionalized surface and the dynamics of the actin cytoskeleton determines motile behavior. Both solid beads and deformable vesicles display either continuous or saltatory propulsive motions, which are analyzed comparatively ; we show that the deformability of liposomes and the mobility of NWASP at the lipid surface affect the dynamic and structural parameters of the actin meshwork. Our results indicate that beads and vesicles use different mechanisms to translate insertional polymerization of actin at their surface into directed movement: stress relaxation within the actin gel prevents the accumulation of filaments at the front of moving beads, while segregation of nucleators reduces actin polymerization at the front of moving vesicles.

<http://www.iop.org/EJ/journal/NJP>



***Article 2:***  
***Soumis à Biophysical Journal***  
***(Révisions mineures en cours)***



## **Arp2/3 controls the motile behavior of N-WASP-functionalized GUVs and modulates NWASP surface distribution by mediating transient links with actin filaments**

Vincent Delatour<sup>1§</sup>, Emmanuèle Helfer<sup>1§</sup>, Dominique Didry<sup>1</sup>, Kim Hô Diêp Lê<sup>1</sup>, Jean-François Gaucher<sup>2</sup>, Marie-France Carlier<sup>1</sup> and Guillaume Romet-Lemonne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cytoskeleton Dynamics and Motility, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques - Université Paris Descartes / CNRS (UMR 8015) Faculté de Pharmacie, 4 av. de l'Observatoire 75006 Paris, France

§ Contributed equally to this work

\* corresponding author: [romet@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:romet@lebs.cnrs-gif.fr)

### **ABSTRACT**

Spatially controlled assembly of actin in branched filaments generates cell protrusions or the propulsion of intracellular vesicles and pathogens. The propulsive movement of giant unilamellar vesicles (GUVs) functionalized by N-WASP (full-length or truncated) is reconstituted in a biochemically controlled medium, and analyzed using phase contrast and fluorescence microscopy to elucidate the links between membrane components and the actin cytoskeleton that determine motile behavior. Actin-based propulsion displays a continuous regime or a periodic saltatory regime. The transition between the two regimes is controlled by the concentration of Arp2/3 complex, which branches filaments by interacting with N-WASP at the liposome surface. Saltatory motion is linked to cycles in the distribution of N-WASP at the membrane between a homogeneous and a segregated state. Comparison of the changes in distribution of N-WASP, Arp2/3 and actin during propulsion demonstrates that actin filaments bind to N-WASP, and that these bonds are transitory. This interaction, mediated by Arp2/3, drives N-WASP segregation. VC-fragments of N-WASP, that interact more weakly than N-WASP with the Arp2/3 complex, segregate less than N-WASP at the rear of the GUVs. GUV propulsion is inhibited by the presence of VCA-actin covalent complex, showing that the release of actin from the nucleator is required for movement. The balance between segregation and free diffusion determines whether continuous movement can be sustained. Computed surface distributions of N-WASP, derived from a theoretical description of this segregation-diffusion mechanism, account satisfactorily for the measured density profiles of N-WASP, Arp2/3 complex, and actin.





## Résumé

Le mouvement cellulaire est organisé par des processus moléculaires qui couplent la dynamique de la membrane plasmique à celle du cytosquelette d'actine, pour engendrer des protrusions cellulaires. Pour analyser le lien fonctionnel entre ces processus et le comportement motile qui en résulte, j'ai utilisé une approche biomimétique. J'ai mis au point une méthode rapide d'électrogonflement de liposomes géants unilamellaires, que j'ai fonctionnalisés avec la protéine N-WASP. Cette protéine catalyse la formation d'un réseau de filaments branchés par le complexe Arp2/3 au bord avant des cellules motiles. Les liposomes, placés dans un milieu reconstitué contenant l'actine, Arp2/3 et les protéines de régulation du treadmilling, sont déformés par la polymérisation insertionnelle de l'actine et se propulsent in vitro. J'ai montré que les liposomes adoptent un régime de propulsion soit continu, soit saltatoire périodique, la transition entre les deux régimes étant contrôlée par la concentration de Arp2/3. Les résultats établissent que le complexe Arp2/3 est le partenaire de N-WASP responsable de l'interaction entre la membrane et les filaments au cours de la réaction de branchement. Cette interaction est transitoire et détermine l'équilibre ségrégation-diffusion de N-WASP dans la bicouche lipidique et la formation d'un réseau cohésif de filaments branchés. Le modèle physique que nous proposons selon lequel l'équilibre ségrégation-diffusion de N-WASP est contrôlé par les paramètres cinétiques du cycle catalytique de branchement, reproduit quantitativement les profils de densité de surface de N-WASP observés expérimentalement.

## Abstract

Cell movement is organized by molecular processes which couple plasma membrane to actin cytoskeleton dynamics, in order to generate cell protrusions. I used a biomimetic approach to reconstitute in vitro site-directed actin polymerization against lipid membranes. To do so, I first synthesised giant unilamellar vesicles (GUVs) by electroformation and functionalized them with actin polymerization activators such as N-WASP. When placed in a reconstituted motility assay made of pure proteins, vesicle grow a branched actin network that propels them in the motility medium. I showed that actin-propelled GUVs undergo continuous or periodic saltatory movement, and that the transition between these two regimes is controlled by the concentration of Arp2/3 complex, which branches filaments by interacting with liposome-bound N-WASP. Phase contrast and fluorescence microscopy show that saltatory motion is linked to cycles in the distribution of N-WASP at the membrane, between a homogeneous and a segregated state. Comparison of the changes in the distributions of N-WASP, Arp2/3 and actin during propulsion demonstrates that actin filaments transiently bind to N-WASP, and that these transient bonds are mediated by the Arp2/3 complex. The interaction of N-WASP-Arp2/3 with the filaments drives segregation. The balance between segregation and free diffusion determines whether continuous movement can be sustained. Computed surface distributions of N-WASP, Arp2/3 complex, and actin, derived from a theoretical description of this mechanism, account satisfactorily for the measured density profiles.