

# Étude du comportement hors-équilibre du cortex cellulaire

Pierre Bohec

#### ▶ To cite this version:

Pierre Bohec. Étude du comportement hors-équilibre du cortex cellulaire. Mécanique statistique [cond-mat.stat-mech]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT: . tel-00870466

## HAL Id: tel-00870466 https://theses.hal.science/tel-00870466

Submitted on 7 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# M S C

## **UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT**

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT

École Doctorale matière condensée et interfaces (ED 518) Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

# Étude du comportement hors-équilibre du cortex cellulaire

présentée

par

Pierre BOHEC

Soutenue le 5 mars 2012 devant le Jury composé de :

Jean-Marc Allain	Maître de Conférences, École polytechnique	Rapporteur
Daniel Navajas	Professeur, IBEC	Rapporteur
Sophie Cribier	Professeure, UPMC	Examinatrice
Pierre Nassoy	Directeur de Recherche, CNRS	Examinateur
Paolo Visco	Chargé de Recherche, CNRS	Examinateur
François Gallet	Professeur, Université Paris-Diderot	Directeur de thèse

# **Table des matières**

A۱	vant-	int-propos		1	
1	Laı	nécani	que cellulaire : aspects biologique et physique	3	
	1.1	La cel	lule : une entité organisée à l'échelle micrométrique	4	
		1.1.1	De l'ADN à la production de protéines	4	
		1.1.2	De l'intérieur à l'extérieur de la cellule	4	
		1.1.3	L'ATP : le carburant de la cellule	5	
		1.1.4	Le cytosquelette : un réseau dynamique	5	
		1.1.5	L'adhésion cellulaire : un transmetteur de forces	13	
		1.1.6	Le vivant est toujours hors-équilibre	15	
	1.2	La cel	lule : un matériau viscoélastique hors-équilibre	18	
		1.2.1	Description théorique d'un matériau viscoélastique hors-équilibre	18	
		1.2.2	De la microrhéologie à la mesure du spectre des forces	21	
	1.3	La mi	crorhéologie de la cellule eucaryote	26	
		1.3.1	Origines	26	
		1.3.2	Les techniques expérimentales de microrhéologie	27	
		1.3.3	Un comportement en loi de puissance	28	
		1.3.4	État de l'art de la mesure de spectre des forces actives et de la		
			violation du théorème de fluctuation-dissipation	32	
2	Dis	Dispositif expérimental et méthodes 39			
	2.1	Appro	che expérimentale	40	
	2.2	Pince	optique	41	
		2.2.1	Histoire et principe	41	
	2.3	Monta	ge expérimental	43	
		2.3.1	Montage de la pince optique	43	
		2.3.2	Cale piézoélectrique	43	
		2.3.3	Calibration du piège optique	46	
		2.3.4	Échantillon expérimental	49	
	2.4	Acqui	sition d'images et détection de particules	50	
		2.4.1	Caméra rapide	50	
		2.4.2	Détection de particules	51	
		2.4.3	Limitations expérimentales	52	

	2.5 2.6	Calcul des transformées de Laplace	54 54	
3	Rés	ultats expérimentaux et effets de la densité de ligand RGD	57	
	3.1	Introduction	58	
	3.2	Résultats expérimentaux sur un exemple témoin	58	
		3.2.1 Microrhéologie passive	58	
		3.2.2 Microrhéhologie active	60	
		3.2.3 Spectre des forces exercées sur la sonde	61	
		3.2.4 Écart du système à l'équilibre thermodynamique	64	
	3.3	Effets de la variation de la concentration de ligand entre la sonde et le cortex	66	
		3.3.1 Nombre de liens bille-cellule	66	
		3.3.2 Fluctuations passives	67	
		3.3.3 Statistiques sur le déplacement quadratique moyen	68	
		3.3.4 Mesure de la fonction de réponse viscoélastique	77	
		3.3.5 Calcul de la fonction de corrélation des forces	79	
		3.3.6 De l'équilibre thermodynamiques aux forces d'origines biologiques	84	
	3.4	Conclusion	87	
4	Мос	dification du métabolisme cellulaire	91	
-	4.1	Introduction	92	
	4.2	Effets de la température	92	
		4.2.1 Résultats expérimentaux	92	
		4.2.2 Discussion	94	
	4.3	Recherche des acteurs biologiques	97	
		4.3.1 Drogues agissant sur le cytosquelette	97	
		4.3.2 Effet des drogues sur les mesures de microrhéologie à température	00	
		4.2.2 Effet des dus sur les mesures de misrouhéologie à température	99	
		4.5.5 Effet des drogues sur les mésures de microrneologie à temperature	110	
			110	
	4 4	4.5.4 Discussion	115	
	4.4	mesures de fincromeologie sur une meme centre avant et apres traitement	117	
		A 4 1 Décultate expérimenteux	117	
		4.4.1 Resultais experimentaux	11/	
	15	4.4.2 Discussion	110	
	4.3		122	
5	Con	clusion	125	
Bi	Bibliographie 129			

# Annexes

A Quelques calculs		139
A.1 Relation		139
A.2 Relation		141
B Protocoles		143
B.1 Protocoles de préparation de l'échantillon biologique		143
B.1.1 Préparation des billes		143
B.1.2 Préparation des lamelles		143
B.1.3 Adhésion des billes sur les cellules		144
B.2 Protocoles d'utilisation des drogues inhibant des processus dans le cytosque	elett	<mark>e</mark> 144
B.2.1 Appauvrissement de la cellule en ATP		144
B.2.2 Inhibition de la polymérisation de l'actine		144
B.2.3 Inhibition des myosines II		144
B.2.4 Utilisation du 2,3-Butanedione monoxime (BDM)		145
C Articles		147

# **Avant-propos**

La cellule vivante sous forme unicellulaire a pour but de survivre et de se reproduire. Quand elle se trouve sous forme d'organisme multicellulaire, son but est la survie et la reproduction de cet organisme à tout prix, fût-ce celui de la mort par apoptose. Afin d'assurer leur rôle, les cellules ont besoin de se mouvoir, de se déformer, de se diviser, d'échanger des informations avec leur environnement. Pour cela, la cellule possède un métabolisme lui permettant de produire et d'utiliser un panel de protéines. Tous ces processus nécessitent un apport de matière et d'énergie que le métabolisme de la cellule va transformer et consommer à travers une multitude de réactions chimiques. Il en résulte que la cellule est, du point de vue de la physique statistique, un système perpétuellement hors-équilibre. En effet, contrairement à d'autres systèmes hors-équilibre convergeant vers l'équilibre, le vivant doit sans cesse se maintenir hors de l'équilibre car l'équilibre thermodynamique est synonyme de mort.

La cellule est capable, en consommant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, d'exercer des forces qui prennent leurs origines dans des réactions biochimiques. Un élément important de la cellule est le cytosquelette, composé principalement de microtubules et de filaments d'actine, il en constitue l'architecture et lui donne l'essentiel de ses propriétés mécaniques. Il est composé de polymères réticulés et, du point de vue de la rhéologie, a un comportement viscoélastique. Au sein du cytosquelette, des processus tels que la polymérisation de l'actine ou des microtubules permettent d'exercer des forces. Des protéines, de la famille des moteurs moléculaires, ont pour rôle spécifique de convertir l'énergie stockée sous forme chimique en énergie mécanique. L'activité mécanique hors-équilibre de la cellule est donc directement reliée à ces forces d'origine biochimique. Dans ce travail, nous avons étudié la distribution statistique des forces d'origine biochimique s'exercant sur une bille de taille micrométrique attachée au cortex d'actine par l'intermédiaire de récepteurs de l'adhésion cellulaire : les intégrines. L'étude des forces d'origine biologique est inséparable de la connaissance des forces d'origine thermique car à cette échelle ( $\sim \mu m$ ) la contribution des forces thermiques n'est pas négligeable. Les forces s'exerçant sur la sonde ont deux origines possibles : biologique ou thermique.

Notre approche expérimentale est basée sur la combinaison de deux techniques de microrhéologie, active et passive, ce qui nous permet de calculer la fonction d'autocorrélation temporelle des forces exercées sur une sonde accrochée à l'actine corticale et de le comparer à la fonction d'autocorrélation des forces thermiques estimée *via* le théorème de fluctuation-dissipation. La différence entre ces deux spectres nous donne une idée de la contribution des forces d'origine biologique au mouvement de la bille et une mesure de l'écart du système à l'équilibre thermodynamique.

Ce travail s'inscrit dans un ensemble de recherches effectuées au laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC). L'étude des propriétés viscoélastiques des cellules à travers diverses techniques de microrhéologie (pinces optiques, microplaques, pince magnétiques, endosomes magnétiques) est une thématique importante de l'équipe Physique du Vivant. De même la mesure des forces exercées par les cellules fait partie des axes de recherches dans le laboratoire MSC avec des expériences utilisant des micropiliers ou des microplaques. Enfin, l'étude générale de la dynamique des systèmes hors-équilibre est aussi un des sujets principaux du laboratoire.

Le premier chapitre est composé d'une introduction sur la biologie cellulaire se focalisant sur la structure et la fonction du cytosqulette, en particulier sur les origines biologiques des forces générées et transmises par le cytosquelette et les protéines associées. La deuxième partie de ce chapitre relie théoriquement, par un modèle de Langevin généralisé, le spectre des forces exercées par un matériau viscoélastique hors-équilibre sur une sonde de taille micrométrique à des grandeurs disponibles expérimentalement avec des mesures de microrhéologie active et passive : la fonction de réponse viscoélastique et le déplacement quadratique moyen. La dernière partie de ce chapitre s'attache à faire une revue non-exhaustive des mesures de viscoélasticité des cellules. Nous finirons cette partie par une synthèse des connaissances existantes sur les mesures de spectres de forces dans des cellules ou des gels actifs mimant le comportement du cytosquelette.

Le deuxième chapitre décrit le dispositif expérimental et les méthodes d'analyse.

Dans une première partie du troisième chapitre, les résultats typiques d'un exemple témoin sont présentés afin de se familiariser avec les grandeurs mesurées. La suite de ce chapitre sera consacrée aux résultats obtenus lorsque l'on fait varier la densité de liens entre la cellule et la bille-sonde.

Dans le dernier chapitre, nous exposerons les résultats des mesures expérimentales quand l'activité biologique du cytosquelette est modifiée. Dans un premier temps nous décrirons l'effet de la température. Puis nous présenterons les résultats obtenus sur des cellules ayant subi un traitement pharmacologique inhibant certains processus actifs du cytosquelette. Nous discuterons l'effet de la déplétion de l'ATP, de la dépolymérisation de l'actine et de l'inhibition des moteurs moléculaires de la famille des myosines.

# CHAPITRE **1**

# La mécanique cellulaire : aspects biologique et physique

### Sommaire

1.1	La ce	Ilule : une entité organisée à l'échelle micrométrique	4
	1.1.1	De l'ADN à la production de protéines	4
	1.1.2	De l'intérieur à l'extérieur de la cellule	4
	1.1.3	L'ATP : le carburant de la cellule	5
	1.1.4	Le cytosquelette : un réseau dynamique	5
	1.1.5	L'adhésion cellulaire : un transmetteur de forces	13
	1.1.6	Le vivant est toujours hors-équilibre	15
1.2	La ce	Ilule : un matériau viscoélastique hors-équilibre	18
	1.2.1	Description théorique d'un matériau viscoélastique hors-équilibre	18
	1.2.2	De la microrhéologie à la mesure du spectre des forces	21
1.3	La mi	crorhéologie de la cellule eucaryote	26
	1.3.1	Origines	26
	1.3.2	Les techniques expérimentales de microrhéologie	27
	1.3.3	Un comportement en loi de puissance	28
	1.3.4	État de l'art de la mesure de spectre des forces actives et de la violation du théorème de fluctuation-dissipation	32

#### 1.1 La cellule : une entité organisée à l'échelle micrométrique

La cellule est la plus petite unité de la matière vivante. Elle possède un métabolisme autonome, délimité par une membrane plasmique, lui permettant d'échanger de l'énergie et de la matière avec son environnement. On distingue deux types de cellules :

- Les cellules procaryotes composées principalement de bactéries ne possédant pas de noyau;
- Les cellules eucaryotes composant les végétaux, les champignons et les animaux, munies d'un noyau et de différents organites.

La structure typique de ces dernières est représentée figure 1.1 gauche. Les cellules eucaryotes, entourées d'une membrane constituée d'une bicouche de lipides (figure 1.1 droite), sont organisées en plusieurs compartiments appelés organites, eux-même entourés d'une membrane.

#### 1.1.1 De l'ADN à la production de protéines

La cellule eucaryote a la particularité de posséder un compartiment intracellulaire, appelé noyau (figure 1.2A et 1.2B), contenant l'information génétique codée dans les filaments d'ADN. L'ADN détient la « recette » de la synthèse des protéines qui sont un élément essentiel à la vie de la cellule. En effet, cette succession d'acides aminés assure la majorité des fonctions cellulaires comme la structure de la cellule, la motilité, l'expression des gènes... Lors de la transcription, l'ARN messager (portion d'ADN codant une protéine) est synthétisé dans le noyau. Puis il traverse l'enveloppe nucléaire pour être décodé et synthétisé dans le ribosome. Ces protéines vont alors être modifiées dans le réticulum endoplasmique (figure 1.2C) et maturées dans l'appareil de Golgi (figure 1.2D). Tous ces compartiments baignent dans un liquide appelé le cytosol qui constitue une réserve de protéines en solution aqueuse. Ces éléments sont soutenus par le cytosquelette qui donne la forme à la cellule. On nomme cet ensemble : le cytoplasme.

#### 1.1.2 De l'intérieur à l'extérieur de la cellule

La cellule possède une bicouche de lipides délimitant le cytoplasme du milieu extracellulaire : la membrane plasmique (figure 1.1 droite). Elle est composée d'une bicouche de cholestérols et de phospholipides. Leur structure composée d'une tête hydrophyle et d'une queue hydrophobe placées en opposition assure la cohérence de la membrane. C'est une barrière sélective qui contrôle les flux de molécules et d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule grâce en partie à des protéines de transport. On trouve dans la membrane des protéines transmembranaires impliquées entre autres dans l'adhésion cellulaire.

À l'extérieur de la cellule se trouve la matrice extracellulaire constituée de protéines telles que le collagène ou la fibronectine. Celles-ci sont sécrétées par la cellule et sont en contact avec la membrane et l'intérieur de la cellule grâce à la protéine transmembranaire appelée intégrine (section 1.1.5). La matrice extracellulaire et les protéines transmembranaire naires associées permettent de créer de fortes adhésions entre la cellule et son substrat.



**FIGURE 1.1** – À gauche, les différents compartiments d'une cellule animale typique. À droite, schéma d'une membrane plasmique et de ses composants. [Wikipédia]

#### 1.1.3 L'ATP : le carburant de la cellule

La production de protéines se fait par une succession de réactions bio-chimiques nécessitant un apport d'énergie. Pour cela, la cellule dispose d'un réservoir d'énergie sous la forme de l'adénosine triphosphate (ATP). La respiration cellulaire permet de synthétiser cette molécule dans les mitochondries (figure 1.2C).

La réaction d'hydrolyse ATP  $\longrightarrow$  ADP + phosphate va libérer une énergie d'environ  $20k_BT$  qui sera aussitôt consommée par une des nombreuses réactions chimiques de la cellule.

#### 1.1.4 Le cytosquelette : un réseau dynamique

#### Les composants du cytosquelette

Le cytosquelette d'une cellule eucaryote (figure 1.3) est constitué de réseaux de filaments sans cesse renouvelés par des réactions de polymérisation et de dépolymérisation. Il constitue l'architecture de la cellule et lui donne la plupart de ses propriétés mécaniques. Il permet à la cellule de s'adapter à son environnement et dispose les organites intracellulaires. Les filaments du cytosquelette peuvent se lier entre eux ou à la membrane plasmique grâce à des protéines réticulantes. Ils relient, par l'intermédiaire de protéines transmembranaires, l'intérieur de la cellule à la matrice extracellulaire ou à d'autres cellules. Ils sont composés de trois sortes de polymères formés à partir de monomères protéiques.

#### Les filaments d'actine

Les filaments d'actine sont un assemblage de monomères d'actine globulaire, de cations divalents (par exemple l'ion calcium) et de nucléotides (l'ATP ou l'ADP). Ces monomères polymérisent en protofilaments qui s'enroulent pour donner une forme hélicoïdale aux filaments d'actine [70]. Chaque monomère d'actine a une structure asymétrique qui conduit à la formation de filaments polarisés. Cette polarisation engendre une différence dans la cinétique de polymérisation entre les deux extrémités (le bout *barbu* polymérise plus vite que le bout *pointu* [77, 75]). Le filament d'actine a un diamètre d'environ 7 nm et une



**FIGURE 1.2** – En A, le noyau en bleu observé par microscopie de fluorescence. En B, le noyau observé au microscope électronique à transmission [Marc Ravallec-INRA]. En C, le réseau membranaire du réticulum endoplasmique est observé ainsi que plusieurs mitochondries (microscope électronique à transmission) [Stamatis Varsamos - Ifremer]. En D, l'appareil de Golgi, reconnaissable à l'empilement caractéristique de ses constituants, les saccules, est visible ici entre deux mitochondries. On distingue également les vésicules de Golgi qui se détachent des saccules. (Image prise au microscope électronique à transmission) [Marc Ravallec-INRA]. Images trouvées sur http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doscel/accueil2.htm.

longueur de persistance de 17  $\mu$ m [43] (ce qui est l'ordre de grandeur de la taille d'une cellule).

L'actine peut s'organiser en un réseau de mailles sous la membrane plasmique, le cortex ( $\sim 50 \text{ nm} - 2 \mu \text{m}$  d'épaisseur [12]) ou dans les lamellipodes ( $\sim 110 - 160 \text{ nm}$  d'épaisseur [1]). On la trouve aussi sous forme de filaments parallèles [88] dans les filopodes ou les fibres de stress. Les filopodes et les lamellipodes sont des protrusions membranaires qui permettent à la cellule de se déplacer. Le cortex d'actine est une structure contractile dense qui supporte la membrane et maintient la cellule sous tension grâce aux moteurs moléculaires qui lui sont associés. La fibre de stress est une structure très organisée et liée à l'extérieur de la cellule par des adhésions focales. Elle peut générer de grandes forces, elle stabilise la structure cellulaire et permet à la cellule de recevoir des informations sur son environnement [39].

#### Les microtubules

Les microtubules sont des polymères composés d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline associées chacune à une molécule de GTP. Ils ont la forme d'un tube d'un diamètre d'environ 25 nm qui leur donne une structure rigide avec une longueur de persistance de 1 mm [43]. Ils polymérisent à partir du centrosome, organe de nucléation des microtubules. À l'instar des filaments d'actine, les microtubules ont une structure polaire qui implique une dynamique de polymérisation différente à chaque extrémité. Le bout *plus* va polymériser plus vite que le bout *moins* enchâssé dans le centrosome. Les microtubules forment un réseau en étoile qui influence la distribution spaciale du noyau, des organites et des autres composants du cytosquelette. Ils jouent un rôle important lors de la mitose ainsi que dans le transport de vésicules intracellulaires.

#### Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont une famille de plusieurs types de polymères qui diffèrent selon leur type cellulaire et leur localisation intracellulaire. Ce sont des structures stables comparées aux filaments d'actine et aux microtubules. Les filaments intermédiaires forment des réseaux qui s'étendent à travers le cytoplasme et autour du noyau, permettant le maintien de l'intégrité cellulaire et le soutien de l'enveloppe nucléaire.

#### De l'énergie bio-chimique à la génération de forces

Une propriété essentielle du cytosquelette est sa structure dynamique qui implique la génération de forces et de mouvements. Celle-ci va permettre aux muscles de se contracter, à la cellule de se mouvoir et d'effectuer des processus biologiques tels que la division cellulaire ou la mitose. Ces forces sont aussi essentielles pour des phénomènes actifs à l'intérieur de la cellule comme le transport de protéines ou le mouvement d'organelles. La cellule dispose d'un panel de protéines qui la place dans une situation hors-équilibre grâce à des réactions bio-chimiques. L'énergie chimique de l'ATP va être utilisée comme combustible et transformée en travail mécanique et en mouvement dirigé. Mais à cette échelle



**FIGURE 1.3** – À gauche, le cytosquelette d'une cellule animale. En bleu, le noyau. En vert, les microtubules. En rouge, les filaments d'actine [Wikipédia]. À droite, le schéma montre les différentes structures du cytosquelette.

(de l'ordre du nanomètre), les protéines vont évoluer dans un environnement où les mouvements dus aux fluctuations thermiques ne sont pas négligeables. Nous allons présenter plusieurs stratégies employées par la cellule pour contrôler ces mouvements fluctuants, exercer des forces et créer des mouvements dirigés.

#### La polymérisation de l'actine

Les filaments d'actine sont sans cesse renouvelés par des réactions de polymérisation (figure 1.4 gauche) et de dépolymérisation qui dépendent de la concentration en monomères d'actine disponibles dans le cytoplasme. Ces réactions ne sont pas symétriques, c'est-àdire qu'elles se font plus rapidement au bout barbu du filament (barbed end) qu'au bout pointu (pointed end) [77, 75]. À l'équilibre, les réactions de polymérisation (ou de dépolymérisation) de l'actine ont la même constante de dissociation (rapport entre les taux de polymérisation et de dépolymérisation) à chaque extrémité (figure 1.4 droite « Sans ATP »). Mais in vivo, l'énergie liée à l'ATP met les filaments hors-équilibre. En effet, lorsqu'un monomère d'actine polymérise, il est accompagné d'une molécule d'ATP. Cet ATP va s'hydrolyser aléatoirement dans le filament et le complexe actine-ATP va devenir actine-ADP. Or l'association actine-ADP a une constante de dissociation plus élevée que l'association actine-ATP. L'extrémité pointue étant moins active, l'actine va rester plus longtemps sous forme de filament et augmenter ses chances de se transformer en actine-ADP. L'équilibre (lorsque le taux de polymérisation est égal au taux de dépolymérisation) du bout pointu va être déplacé vers la dépolymérisation (et inversement pour l'autre extrémité). Il en résulte que pour certaines valeurs de la concentration en monomères l'extrémité barbue va croître et l'autre décroître (figure 1.4 droite « Avec ATP »). Le tapis-roulant fournit une bonne image de la cellule qui recycle, en les repolymérisant au bout *barbu*, les monomères ayant quitté le bout *pointu*. D'ailleurs ce phénomène en anglais se nomme *treadmilling* [116].



**FIGURE 1.4** – À gauche, la polymérisation de l'actine. À droite, graphe montrant l'évolution du taux de polymérisation de l'actine en absence et en présence d'ATP. Pour certaines valeurs de la concentration d'actine en présence d'ATP, le bout *barbu* polymérise et le bout pointu dépolymérise : c'est le *treadmilling*.

Il n'est pas évident que ce processus de tapis-roulant puisse générer des forces. On peut pourtant le comprendre en faisant appel au modèle du *Brownian ratchet* [74] dans lequel le filament d'actine pousse une charge pouvant être la membrane plasmique. Si le filament touche la charge (figure 1.5a1), comment un autre monomère peut-il s'introduire entre la charge et le filament afin de polymériser? Cette charge, de petite taille et donc soumise aux forces thermiques, va fluctuer dans la direction opposée au filament qui la gêne. Ces fluctuations vont permettre de laisser passer un monomère entre le filament et la charge (figure 1.5a). Ainsi, la polymérisation va pouvoir exercer une force sur la charge. Un modèle dérivé [69] utilise les fluctuations thermiques, non pas pour déplacer la charge mais pour courber le filament et créer un espace entre lui et la charge (figure 1.5b). Ce modèle s'appelle l'*Elastic brownian ratchet* car l'énergie élastique stockée lors de la courbure va permettre de pousser la charge.

Le phénomène de *treadmilling*, à l'origine du mouvement de la bactérie *listeria* [103], est utilisé par certaines cellules eucaryotes pour se déplacer au moyen d'un lamellipode [114, 102]. Cependant dans une cellule ce processus est plus complexe notamment car il existe des protéines associées à l'actine.

#### Les protéines associées à l'actine

Dans le réseau d'actine, en plus des processus actifs de polymérisation, on trouve des protéines régulatrices qui vont favoriser ou non la polymérisation, permettre la réticulation entre plusieurs filaments, fragmenter les filaments [82]... Certaines protéines ont pour rôle



**FIGURE 1.5** – Les schémas des modèles du *brownian ratchet* et de l'*elastic brownian ratchet* sont extraits de [52]. Le mouvement brownien contribue à la génération de forces soit en faisant fluctuer la charge (figure a), soit en courbant le filament d'actine (figure b) permettant à un monomère de polymériser.

de coopérer avec la polymérisation afin d'exercer des forces. Elles peuvent elles-mêmes être considérées comme des moteurs indépendants produisant un travail mécanique. On distingue plusieurs familles de protéines :

- Les protéines de réticulation telles que la fimbrine ou l'α-actinine permettent aux filaments d'actine de s'organiser en faisceaux parallèles qui sont une architecture présente dans les filopodes ou les fibres de stress. Grâce à d'autres protéines comme l'ARP2/3 ou la filamine, l'actine peut former des gels denses réticulés que l'on trouve dans le cortex d'actine.
- Les protéines de nucléation dont la fonction est d'initier la polymérisation. Par exemple, le complexe ARP2/3 est à l'origine de jonctions qui permettent à un nouveau filament de polymériser avec un angle de 70°C par rapport au filament-père [99]. À ce titre, ARP2/3 est à la fois une protéine de nucléation et de réticulation.
- Les protéines de séquestration régulent la quantité de monomères d'actine dans le cytoplasme. Par exemple, la profiline favorise le remplacement de l'ADP par l'ATP [104] sur les monomères. Ceci permet au nouveau complexe d'actine-ATP de s'insérer à l'extrémité *barbue* d'un filament.
- Les protéines de fragmentation parmi lesquelles la cofiline qui produit une augmentation de la dépolymérisation [15] en se liant aux complexes d'actine-ADP et

accélère ainsi le phénomène de treadmilling.

- Les protéines de coiffe (*CApping Proteins*) peuvent s'attacher au bout *barbu* afin d'empêcher la polymérisation.
- Les protéines de stabilisation comme la tropomyosine qui s'enroule autour des filaments pour les stabiliser et les rigidifier.
- Les moteurs moléculaires, principalement les myosines, qui sont l'objet du paragraphe 1.1.4.

Un exemple de coopération de ces protéines avec la polymérisation de l'actine est la croissance du lamellipode qui a une fonction essentielle dans la motilité cellulaire. On peut voir sur la figure 1.6 comment les différents acteurs cités précédemment travaillent ensemble pour permettre au gel d'actine de pousser sur la membrane et de croître à une vitesse d'environ 1  $\mu$ m/min [109].



FIGURE 1.6 – Modèle de croissance de l'actine dans le lamellipode. Extrait de [76].

Nous avons vu que la coopération entre les protéines associées à l'actine et la polymérisation aidait la génération de forces. Néanmoins, on peut comprendre avec un modèle [95] comment deux filaments réticulés exercent à eux seuls des forces et mettent un système hors-équilibre. Le cytosquelette est dans ce cas composé de filaments d'actine qui peuvent s'attacher les uns aux autres grâce à des protéines (par exemple l' $\alpha$ -actinine). La réticulation est transitoire et les protéines se lient et se délient de façon dynamique (figure 1.7A). Considérons deux murs amovibles, sur chacun est attaché un filament d'actine et autour des protéines réticulantes sont en solution. Les filaments et les murs sont soumis à l'énergie thermique qui aura tendance à les éloigner mais peut permettre aux deux filaments de se rencontrer. Une protéine réticulante va pouvoir les lier. Ensuite, les fluctuations thermiques fourniront d'autres sites de chevauchement et donc de possibles nucléations (figure 1.7B). Cette dynamique va générer des contractions et ainsi des forces sur les murs. Si l'on considère que ces deux filaments sont attachés l'un à l'autre par l'intermédiaire d'un autre filament (figure 1.7C) et que celui-ci dépolymérise alors on se retrouve dans le cas précédent où les deux filaments réticulent. Donc la dépolymérisation peut aussi être à l'origine de forces dans le cytosquelette.



**FIGURE 1.7** – La dynamique des protéines réticulantes (*cross-linkers*) est suffisante pour créer des forces dans le cytosquelette. Extrait de [95].

#### La polymérisation des microtubules

De façon similaire à l'actine, les tubulines polymérisent et dépolymérisent constamment pour former un réseau dynamique de microtubules. La polarité joue un rôle sur les vitesses de polymérisation à chaque bout. De plus, les complexes  $\beta$ -tubuline-GTP peuvent s'hydrolyser en un complexe  $\beta$ -tubuline-GDP. Celui-ci affaiblit les liaisons du microtubule et peut créer des *catastrophes*, c'est-à-dire des périodes de dépolymérisation rapide. Ces dynamiques entraînent des phénomènes de *treadmilling*. Le réseau de microtubules peut alors exercer des forces sur la cellule. Enfin, des protéines sont associées au microtubule ou à la tubuline et permettent de réguler la polymérisation, de les attacher à la membrane, etc.

#### Les moteurs moléculaires

Dans le cytosquelette, il y a un type de protéines dont le rôle est explicitement de transformer l'énergie de l'ATP en travail mécanique : les moteurs moléculaires. Il en existe plusieurs familles dont les moteurs spécialisés dans le transport le long des filaments du cytosquelette : les **myosines** qui travaillent au niveau des filaments d'actine et les **dynéines et kinésines** associées aux microtubules.

Les myosines sont des moteurs moléculaires qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des filaments d'actine. Il existe plusieurs formes de myosines [87, 18] (des myosines I aux myosines XV, figure 1.8) ayant différentes fonctions dans la cellule. Par exemple les myosines V et VI sont impliquées dans le transport de vésicules dans le cytoplasme et les myosines I s'attachent à la membrane plasmique et exercent une force sur un filament d'actine [65]. Mais les myosines II sont de loin les plus étudiées car elles sont directement impliquées dans la contraction musculaire. De plus, elles sont connues pour être abondantes dans le cortex cellulaire, zone qui nous intéressera par la suite. Les myosines II sont constituées de deux têtes globulaires ayant un site de fixation à l'actine et pouvant accueillir une molécule d'ATP, une queue permettant aux myosines de se fixer entre elles et de créer des myofilaments. La production de force se fait en cinq étapes (figure 1.9). Au début, la myosine est attachée au filament d'actine mais elle n'est pas liée à un ATP. Au moment où une molécule d'ATP rencontre la myosine, celle-ci se détache du filament. L'hydrolyse de l'ATP en ADP-phosphate va changer la conformation de la myosine en déplaçant sa tête de 11 nm [33]. Ensuite la myosine va se raccrocher à l'actine en libérant le phosphate. Puis elle va retrouver sa configuration initiale en libérant l'ADP. En agissant comme un bras de levier, elle va exercer une force sur l'actine. Les myosines tirent toujours dans le même sens en se déplaçant vers le bout barbu. Afin de créer des forces contractiles, elles s'associent et tirent simultanément sur des filaments aux extrémités opposées. In vitro, la force moyenne exercée par une myosine est égale à 3-4 pN [33].

Les **dynéines** et **kinésines** sont des moteurs se déplaçant sur les microtubules qui ont un rôle dans le transport d'organites et de vésicules ainsi que dans la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire. La plupart des dynéines se déplacent vers l'extrémité *moins* des microtubules contrairement à la majorité des kinésines. Ces dernières sont capables d'exercer des forces de 5 pN et de « marcher » sur les microtubules en faisant des pas de 8 nm [110].

#### 1.1.5 L'adhésion cellulaire : un transmetteur de forces

Afin d'assurer leurs fonctions, la plupart des cellules ont besoin de créer des contacts entre elles ou avec la matrice extracellulaire. Ces contacts sont indispensables pour former des tissus et ils constituent des points d'ancrage permettant à la cellule de se mouvoir. De plus, par l'intermédiaire de ces interactions, la cellule va pouvoir recevoir des informations



**FIGURE 1.8** – La famille des myosines. Malgré leur diversité et leurs rôles différents, les myosines ont toutes une tête globulaire et une queue. La génération de force se fait grâce à un changement de conformation induit par l'ATP qui agit comme un bras de levier. Extrait de http://manual.blueprint.org/.



FIGURE 1.9 – Les cinq étapes qui permettent à la myosine II de générer des forces. Aidé de [2].

sur son environnement mécanique et les traduire en signaux bio-chimiques. Il s'agit du phénomène de mécanotransduction. D'une certaine manière, la cellule possède un « sens du toucher » qui va influencer des fonctions cellulaires importantes telles que la migration, la différenciation ou la mort cellulaire. Les molécules d'adhésion sont donc capables de

transmettre au cytosquelette les contraintes appliquées par le monde extérieur. Inversement, elles peuvent aussi transmettre des forces exercées par le cytosquelette à l'environnement. Nous allons d'ailleurs utiliser par la suite ces propriétés pour sonder la dynamique du cytosquelette. On distingue principalement deux types de protéines associées à l'adhérence :

- La famille des cadhérines impliquée dans la jonction entre cellules ;
- La famille des intégrines (figure 1.10) qui crée des liaisons entre la cellule et la matrice extracellulaire. Seule cette dernière, utile à la poursuite de notre étude, sera décrite.

Les intégrines sont des protéines transmembranaires ce qui signifie qu'elles possèdent un domaine intracellulaire qui interagit avec le cytosquelette, un second domaine confiné dans la membrane et un dernier à l'extérieur de la cellule qui interagit avec la matrice extracellulaire. Elles sont composées de deux unités, l' $\alpha$ -intégrine et la  $\beta$ -intégrine qui se lient à des sites spécifiques de la matrice extracellulaire. Il existe plusieurs types d'intégrines pouvant s'attacher à différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou la fibronectine.

La fibronectine est un dimère possédant deux séquences d'amino-acide RGD (arginine (ARG); glycine (GLY); acide aspartique (ASP)) qui sont des sites importants pour la fixation des intégrines. Elle est reconnue par au moins dix types d'intégrines différents [51]. Plusieurs sites de la fibronectine peuvent être reconnus par les intégrines, et le RGD seul est reconnu par cinq types d'intégrines ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 6$ ) [51].

Du côté intracellulaire, l'intégrine est reliée aux filaments d'actine par l'intermédiaire de plusieurs protéines ( $\alpha$ -actinine, talin, filamine, paxiline...) [60]. Les intégrines peuvent se rassembler en *cluster* et former un complexe appelé *adhésion focale* qui permet de créer un ancrage fort à la matrice extracellulaire. Des fibres de stress riches en moteurs moléculaires peuvent s'y attacher afin d'exercer de grandes forces de traction.

#### 1.1.6 Le vivant est toujours hors-équilibre

La taille d'une cellule est comprise entre 10 et 100  $\mu$ m. La cellule est donc une incroyable machinerie organisée au niveau submicronique. En physique des liquides, on a l'habitude de voir le mouvement brownien dominer à cette échelle. Et pourtant, l'agitation thermique n'empêche aucunement la coordination des protéines permettant à la cellule de se diviser, de se mouvoir, d'interagir avec son environnement et de s'auto-organiser pour créer des organes. Au contraire, comme nous avons pu le voir pour le *brownian ratchet*, le bruit thermique va même assister la génération de force et de mouvement.

Comment le vivant fait-il pour générer des forces et des mouvements dirigés dans ce désordre moléculaire ? Le vivant utilise des processus actifs qui consomment de l'énergie et qui le placent par conséquent dans la famille des systèmes thermodynamiques horséquilibre. La cellule produit des protéines motrices qui lui permettent de convertir l'énergie stockée sous forme chimique en un travail mécanique. Mais contrairement aux moteurs macroscopiques qui effectuent leur cycle de façon déterministe, les moteurs moléculaires ont un mouvement stochastique. Pour avoir un mouvement dirigé, ces derniers ont besoin de deux éléments : une source d'énergie et une asymétrie qui va déterminer la direction



**FIGURE 1.10** – Schéma d'une intégrine composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans la région extracellulaire, l'intégrine peut se lier au peptide RGD. Dans la région intracellulaire, l'intégrine est reliée au cytosquelette d'actine *via* différentes protéines telles que l' $\alpha$ -actinine ou la taline... Adapté de Wikipédia et d'après [11]

du mouvement. Par exemple, pour les myosines, l'énergie vient de l'hydrolyse de l'ATP et l'asymétrie est donnée par la polarité des filaments d'actine.

Mais un système asymétrique seul, à l'équilibre (*i.e.* sans source d'énergie extérieure) peut-il créer un travail récupérable par un système vivant ? Marian Smoluchowski [36] et plus tard Richard Feynman [32] avaient imaginé une machine (figure 1.11) permettant de convertir les fluctuations thermiques en un travail mécanique. Le dispositif est formé d'un axe qui possède à une extrémité une roue à palette et de l'autre côté une roue dentée associée à un clapet. Le clapet permet la brisure de symétrie car la roue ne peut tourner que dans un sens. La machine, de toute petite taille, est plongée dans un bain. Les palettes subissent les chocs des particules browniennes qui en tapant sur les palettes peuvent entraîner la rotation de la roue dans un seul sens, l'autre sens étant gêné par le clapet. Si on accroche une masse à une poulie reliée à l'axe de rotation, le système serait-il capable de la soulever? Non, car il ne faut pas oublier le mouvement brownien du clapet qui, lui aussi, subit des chocs moléculaires suceptibles de débloquer la roue. En fin de compte, aucun sens de rotation ne sera privilégié; la roue ne tournera pas en moyenne. Il est donc impossible de créer un moteur utilisant l'énergie thermique sinon la deuxième loi de la thermodynamique serait brisée. Par contre, Feynman démontre qu'il est possible de soulever la masse si on éloigne le système de l'équilibre en imposant une différence de température entre la palette

et la roue dentée. Dans ce cas, l'apport d'énergie externe vient du transfert de chaleur entre les deux sources de températures différentes.

Une cellule doit exercer des forces pour rester vivante, elle est donc obligatoirement un système thermodynamique hors-équilibre. Dans le cas contraire, la cellule devient une matière inerte. Peut-t-on vérifier que la cellule vivante est un système hors-équilibre ? Quelle est la différence entre une cellule hors-équilibre et son équivalent physico-chimique à l'équilibre ? C'est-à-dire, peut-on mesurer l'écart entre l'activité biologique d'une cellule et l'activité des forces thermiques agissant dans son milieu ? Et enfin comment mesurer les forces stochastiques générées par le métabolisme cellulaire ?



**FIGURE 1.11 – La machine imaginaire de Feynman. Schéma extrait du site** http://flakesandclusters.com/whatisgoodinlife.

#### 1.2 La cellule : un matériau viscoélastique hors-équilibre

Du point de vue de la biologie, la mécanique du cytosquelette joue un rôle important dans beaucoup de processus cellulaires. Du point de vue de la physique, le cytosquelette est un réseau de polymères actifs qui en font un matériau viscoélastique hors-équilibre. L'étude de la mécanique du cytosquelette a donc un double intérêt : avancer dans la compréhension des mécanismes qui régissent une grande quantité de processus biologiques et utiliser la cellule comme modèle pour tester et faire évoluer la physique des systèmes thermodynamiques hors-équilibre.

La cellule est sans cesse soumise à des contraintes mécaniques venant de son environnement. Ces contraintes peuvent être exercées par une autre cellule, par la matrice extracelullaire ou même par un fluide (c'est le cas par exemple pour l'écoulement sanguin). Dans tous les cas, la cellule s'adapte grâce aux forces générées par le cytosquelette. De plus, cet environnement modifie les fonctions cellulaires. Il a par exemple été montré que la rigidité du substrat avait un effet sur la différenciation des cellules souches [27] ainsi que sur l'adhésion et la migration cellulaire [61]. Les propriétés mécaniques du cytosquelette ont donc une place importante dans la physiologie cellulaire. Leur compréhension pourrait avoir des implications en médecine telles que l'utilisation thérapeutique des cellules souches. Il est nécessaire de pouvoir mesurer les caractéristiques mécaniques des cellules. L'étude de leur rhéologie devient alors indispensable pour quantifier leur comportement mécanique.

La structure complexe du cytosquelette, formé de polymères enchevêtrés, où différents types de protéines se lient dynamiquement et exercent des forces, confère à la cellule un comportement viscoélastique hors-équilibre. Une cellule va se comporter à la fois comme un liquide visqueux et un solide élastique. Ceci nous amène à définir un cadre théorique permettant de décrire toutes les caractéristiques mécaniques d'une cellule vivante. Cette approche, utilisant un modèle de Langevin généralisé, nous permet de définir les grandeurs intéressantes pour la description de la mécanique cellulaire et ainsi de calculer une expression du spectre des forces agissant dans la cellule. L'utilisation de techniques de microrhéologie nous donne la possibilité de mesurer ces grandeurs *ex vivo*.

#### 1.2.1 Description théorique d'un matériau viscoélastique hors-équilibre

#### Modèle de Langevin généralisé

Une façon commode de décrire théoriquement un matériau viscoélastique hors-équilibre, est d'écrire l'équation du mouvement d'un objet dans ce milieu. Cette particule, de taille microscopique, sera soumise à des forces stochastiques d'origine thermique et biologique et à une force dissipative. L'évolution temporelle de la vitesse de la particule peut être modélisée en introduisant l'équation de Langevin généralisée [71],

$$m\frac{d\vec{v}}{dt} + m\int_{-\infty}^{t} \vec{\gamma}(t-t') \cdot \vec{v}(t') dt' = \vec{f}(t) + \vec{F}_{\text{ext}}(t), \qquad (1.1)$$

- *m* est la masse de la particule.
- $-\vec{v}(t)$  est la vitesse de la particule.
- $-\vec{f}(t)$  est la force stochastique s'exerçant sur la particule. Dans le cas présent, elle a deux origines possibles : les forces thermiques  $\vec{f}_{th}(t)$  et les forces d'origine biologique  $\vec{f}_{actif}(t)$ . Certains auteurs estiment que les forces thermiques et non-thermiques ne sont pas corrélées et écrivent :  $\vec{f}(t) = \vec{f}_{th}(t) + \vec{f}_{actif}(t)$  [67].  $\vec{f}_{actif}(t)$  est la grandeur qui mène le système hors de l'équilibre thermodynamique et que nous voulons caractériser.
- $\vec{F}_{ext}(t)$  est une force extérieure éventuellement exercée par l'expérimentateur sur la particule.
- le terme  $\int_{-\infty}^{t} m \vec{\gamma}(t-t') \cdot \vec{v}(t') dt'$  est la force dissipative  $\vec{F}_{\text{disspative}}$  exercée par le milieu viscoélastique sur la particule qui prend en compte une réponse retardée.
- le terme  $m\frac{d\vec{v}}{dt}$  est la force d'inertie de la particule qui est négligeable.

#### La force dissipative

La force de frottement subie par une bille de rayon r et se déplaçant à la vitesse  $\vec{v}$  en immersion dans un fluide newtonien de viscosité  $\eta$  est donnée par la relation de Stokes :

$$\vec{F}_{\text{visqueux}} = -6\pi\eta r \vec{v}.$$

La force de rappel subie par une bille de rayon r se déplaçant d'une distance  $\vec{x}$  en immersion dans un milieu élastique incompressible de module d'Young E, s'écrit :

$$\vec{F}_{\text{élastique}} = -2\pi E r \vec{x}$$

Dans le cas d'un milieu viscoélastique, à cause de ses propriétés élastiques, le frottement ne s'établit pas instantanément comme dans le cas du frottement visqueux. En effet l'énergie fournie va d'abord être emmagasinée par la déformation élastique pour ensuite être dissipée par le frottement visqueux. Il y a donc des effets de retard sur l'application de la force de frottement. On tient compte de ces effets en écrivant que la force dissipative à l'instant *t* dépend de la vitesse de l'objet aux instants antérieurs. On écrit alors que la force dissipative retardée est la réponse linéaire de la perturbation  $\vec{v}$  pour une particule plongée dans un milieu supposé linéaire, isotrope<sup>1</sup>, incompressible de susceptibilité  $\gamma$ :

$$\vec{F}_{\text{dissipative}}(t) = -\int_{-\infty}^{t} m\gamma(t-t') \,\vec{v}(t') \,dt'.$$
(1.2)

La quantité  $\vec{\gamma}(t)$  est un *noyau mémoire* décrivant les propriétés viscoélastiques du milieu et, en vertu du principe de causalité,  $\vec{\gamma}(t) = 0$  si t < 0. Cette fonction contient la réponse viscoélastique du matériau pour une géométrie de contact donnée entre l'objet et le milieu.

L'expression de la force de frottement est générale même si la particule n'est pas en immersion totale dans le milieu. Ceci n'est pas le cas pour l'expression de la force de rappel

1. Dans le cas d'un milieu anisotrope, la relation 1.2 est tensorielle :  $\vec{F}_{\text{dissipative}} = \begin{pmatrix} \gamma_{xx} & \gamma_{xy} \\ \gamma_{yx} & \gamma_{yy} \end{pmatrix} \cdot \vec{v}$ .

et de la force visqueuse qui ont un terme représentant la réponse visqueuse ou élastique (respectivement la viscosité et le module d'Young) et un coefficient décrivant le contact géométrique entre la particule et le milieu (respectivement  $6\pi r$  et  $2\pi r$ ). Dans le cas où l'objet n'est pas totalement immergé, la force dissipative a une expression différente à cause de la géométrie d'immersion. On peut néanmoins écrire une relation de réponse linéaire sous la forme de l'équation 1.2, les coefficients géométriques sont alors cachés dans  $\vec{F}_{\text{dissipative}}$  et  $\gamma$ .

#### Le spectre des forces

La force f(t) est la contribution des forces d'origine thermique et des forces d'origine biologique. C'est le résultat du choc des molécules du milieu viscoélastique sur l'objet ainsi que du travail des processus bio-mécaniques décrits dans la partie 1.1. Étant donné qu'il est impossible d'expliciter la force f(t), nous allons la considérer comme une variable aléatoire. Ainsi pour décrire l'évolution temporelle de la force fluctuante f(t), nous avons recours au calcul de valeur moyenne et de fonction de corrélation temporelle,

$$\langle f(t)f(t+\tau)\rangle_t.$$
 (1.3)

L'équation 1.1 d'évolution de la particule en l'absence de force extérieure et d'inertie, et projetée dans une direction  $(\perp \text{ ou } \parallel)$  s'écrit :

$$m\int_{-\infty}^{t} \gamma(t-t') v(t') dt' = f(t). \qquad (1.4)$$

Cette équation intégro-différentielle linéaire peut être analysée en utilisant les propriétés des transformées de Laplace<sup>2</sup>. On définit la transformée de Laplace d'une fonction g(t) où *s* est homogène à une fréquence :

$$\mathscr{L}\lbrace g\rbrace(s) = \int_{0}^{\infty} g(t) \exp(-st) dt = \hat{g}(s).$$

En utilisant le fait que la transformée de Laplace d'un produit de convolution est le produit des transformées de Laplace<sup>3</sup>, on peut réécrire l'équation 1.4 :

$$m\hat{\boldsymbol{\gamma}}(s)\,\hat{\boldsymbol{v}}(s) = \hat{f}(s)\,. \tag{1.5}$$

Introduisons les transformées de Laplace des fonctions d'autocorrélation des vitesses et des forces fluctuantes appelées spectre des forces :

$$\hat{S}_f(s) = \mathscr{L}\{\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t\} \text{ et } \hat{S}_v(s) = \mathscr{L}\{\langle v(t+\tau)v(t)\rangle_t\}.$$

<sup>2.</sup> Habituellement, on fait une analyse harmonique avec des transformées de Fouriers pour ce type d'équation. Mais ici, les fonctions ne sont pas intégrables sur  $\mathbb{R}$ .

<sup>3.</sup> En effet le terme de gauche de l'équation 1.4 est un produit de convolution entre  $\gamma(t)$  et v(t). On pourrait réécrire cette équation :  $f(t) = m\gamma \otimes v(t)$ .

En prenant l'équation 1.5 au carré, on trouve d'après l'annexe A.1 :

$$\hat{S}_f(s) = m^2 \hat{\gamma}^2(s) \hat{S}_v(s).$$
(1.6)

On obtient une relation qui donne accès au spectre des forces fluctuantes s'exerçant sur la particule, à condition de connaître à la fois la réponse viscoélatique du milieu  $\hat{\gamma}^2(s)$ et le spectre des vitesses en l'absence de forces extérieures  $\hat{S}_{\nu}(s)$ . Nous allons voir que la fonction  $\gamma(t)$  est reliée à la fonction J(t) qui est une grandeur mesurable grâce à la **microrhéologie active**. Le spectre des vitesses  $\hat{S}_{\nu}(s)$  est une fonction disponible à partir d'une mesure de **microrhéologie passive**.

#### 1.2.2 De la microrhéologie à la mesure du spectre des forces

Pour commencer, nous allons voir comment la rhéologie permet de caractériser les matériaux viscoélastiques et quelles grandeurs permettent de les quantifier. Puis nous décrirons les principes de la microrhéologie permettant de faire de la rhéologie sur des cellules. Enfin, nous relierons le spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  à des grandeurs disponibles avec des expériences de microrhéologie.

#### Rhéologie et microrhéologie

La rhéologie est l'étude macroscopique de la déformation  $\varepsilon$  et de l'écoulement  $\dot{\varepsilon}$  de la matière sous l'effet d'une contrainte  $\sigma$ . Elle permet de définir des grandeurs caractérisant le comportement mécanique de la matière. Nous allons rester dans le domaine de la rhéologie linéaire en considérant de faibles déformations pour des matériaux isotropes, homogènes et incompressibles (coefficient de Poisson v = 1/2). Par exemple, lorsque l'on applique une force F sur un solide élastique de longueur  $l_0$  et de section S, celui-ci va emmagasiner toute l'énergie et s'étirer de  $\Delta l$ . Ce solide sera caractérisé par le module d'Young E reliant proportionnellement la contrainte  $\sigma = F/S$  à la déformation  $\varepsilon = \delta l/l_0$ :

$$\sigma = E\varepsilon. \tag{1.7}$$

De même en géométrie de cisaillement (figure 1.12), un solide élastique est caractérisé par le coefficient de cisaillement G tel que  $\sigma = G\varepsilon$  (dans le cas de matériau incompressible E = 3G). Enfin, un fluide visqueux soumis à un cisaillement va dissiper l'énergie et s'écouler. Le fluide sera caractérisé par la viscosité  $\eta$  reliant proportionnellement la contrainte  $\sigma$  au taux de déformation  $\dot{\varepsilon}$ :

$$\sigma = \eta \dot{\varepsilon}.\tag{1.8}$$

Un matériau viscoélastique renferme ces deux comportements, il emmagasine puis dissipe l'énergie fournie. Il est décrit par le module viscoélastique de relaxation G(t):

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^{t} G\left(t - t'\right) \left. \frac{d\varepsilon}{dt'} \right|_{t'} dt'.$$
(1.9)

En forçant le cisaillement dans un régime sinusoïdal de déformation tel que  $\varepsilon(t) = \mathbb{R}(\varepsilon_0 e^{i\omega t})$ on définit le module dynamique de cisaillement  $G(\omega)$ ,

$$G(\boldsymbol{\omega}) = \frac{\sigma(\boldsymbol{\omega})}{\varepsilon(\boldsymbol{\omega})} = G'(\boldsymbol{\omega}) + iG''(\boldsymbol{\omega}), \qquad (1.10)$$

où  $G'(\omega)$  est la partie réelle appelée module de stockage ou élastique et  $G''(\omega)$  la partie imaginaire appelée module de perte ou visqueux.

Le module viscoélastique de relaxation établit la relation entre la déformation appliquée et la contrainte d'un matériau. Ce qui nous intéresse davantage est la relation inverse entre la contrainte appliquée et la déformation. La réponse du matériau viscoélastique est alors définie par la fonction de fluage  $\Gamma(t)$  telle que :

$$\varepsilon(t) = \int_{-\infty}^{t} \Gamma\left(t - t'\right) \left. \frac{d\sigma}{dt'} \right|_{t'} dt'.$$
(1.11)

En vertu du principe de causalité, on a  $\Gamma(t) = 0$  pour t < 0. Pendant une expérience dite de fluage, la contrainte exercée sur le matériau est constante donc  $\Gamma(t) = \varepsilon(t)/\sigma$ . On montre que pour un solide purement élastique  $\Gamma(t) = E^{-1}$  et pour un liquide purement visqueux  $\Gamma(t) = t/\eta$ .

Le module dynamique de cisaillement  $G(\omega)$  et la fonction de fluage contiennent la même information et on peut établir un lien entre les deux grâce à la transformée de Fourier [7] :

$$G(\boldsymbol{\omega}) = \frac{1}{i\boldsymbol{\omega}\tilde{\Gamma}(\boldsymbol{\omega})} \text{ où } \tilde{\Gamma}(\boldsymbol{\omega}) = \int_{-\infty}^{+\infty} \Gamma(t)e^{i\boldsymbol{\omega}t}dt.$$
(1.12)



FIGURE 1.12 – Schéma de principe du cisaillement [Wikipédia].

En général, les rhéologues travaillent sur des volumes importants (> 1 cm<sup>3</sup>) afin de sonder des propriétés mécaniques moyennes. La microrhéologie permet de mesurer la rhéologie de petits volumes de matière ce qui est intéressant pour l'étude des matériaux d'origine biologique. Il est alors possible d'étudier toutes sortes de matériaux hétérogènes

(*e.g.* nouveaux matériaux synthétiques, cytoplasme de cellules vivantes) dans des géométries confinées. La microrhéologie offre la possibilité de travailler sur des objets aussi petits et aussi complexes que les cellules vivantes.

Depuis plusieurs années, les chercheurs développent des techniques de microrhéologie active et passive. Certaines permettent de mesurer la rhéologie de la cellule de manière globale (microplaque, micropipette), d'autres de manière locale. La microrhéologie locale nécessite la plupart du temps l'utilisation d'une sonde de taille micrométrique. Ces sondes peuvent être des billes attachées spécifiquement ou non au cytosquelette ou alors des éléments même de la cellule (endosomes, phagosomes, granules...).

Le principe de la microrhéologie active est proche de la rhéologie classique, où l'expérimentateur exerce sur la sonde une force et mesure son déplacement. La sonde peut être partiellement ou totalement immergée dans la cellule. Dans tous les cas, pour calculer la grandeur caractérisant le matériau (module viscoélastique  $G(\omega)$  ou fonction de fluage  $\Gamma(t)$ ) il faut connaître la géométrie de contact avec le milieu et en déduire un coefficient géométrique permettant de passer de la représentation position  $\leftrightarrow$  force à déformation  $\leftrightarrow$ contrainte.

La microrhéologie passive est une méthode exclusivement locale où on enregistre la trajectoire de la sonde soumise aux forces stochastiques s'exerçant dans le milieu (suivi de particules). Cette technique suppose que le système soit à l'équilibre afin d'appliquer le théorème de fluctuation-dissipation et d'en déduire la réponse linéaire du milieu (section 1.2.2). Seulement, le vivant n'est pas à l'équilibre. Nous allons voir comment utiliser ces techniques de microrhéologies pour sonder les forces stochastiques du cytosquelette menant la cellule hors de l'équilibre thermodynamique.

#### La mesure de microrhéologie active

Un façon de caractériser la viscoélasticité du milieu en contact avec la particule est de mesurer sa réponse linéaire lorsqu'est exercée une force  $\vec{F}_{ext}(t)$ . Pour décrire l'évolution de la particule en présence d'une force extérieure  $\vec{F}_{ext}(t)$ , on réécrit l'équation 1.1 sans inertie :

$$m \int_{-\infty}^{t} \vec{\gamma} \left( t - t' \right) \cdot \vec{v} \left( t' \right) dt' = \vec{f} \left( t \right) + \vec{F}_{\text{ext}} \left( t \right).$$
(1.13)

Dans cette équation, il y a deux inconnues : les forces stochastiques f(t) composées des forces thermiques et biologiques, et la fonction  $\gamma(t)$  représentant la réponse du milieu viscoélastique. Pour connaître cette dernière, il faut faire une approximation et considérer  $f \ll F_{\text{ext}}$ . Cette forte approximation est justifiée par le fait que  $f \sim \text{pN}$  alors que  $F_{\text{ext}} \sim 10 - 100 \text{ pN}$ .

En pratique, il est plus commode de mesurer le déplacement d'un objet en réponse à la force extérieure fixée et connue par l'expérimentateur. Donc plutôt que d'avoir une relation force  $\leftrightarrow$  vitesse reliée par  $\gamma(t)$  on préfère écrire une relation position  $\leftrightarrow$  force reliée par J(t). En exerçant la force  $F_{\text{ext}}$  dans une direction (avec  $F_{\text{ext}}(t \leq 0) = 0$ ), on peut projeter

l'équation 1.13 dans cette direction et écrire les relations équivalentes :

$$\int_{0}^{t} m\gamma(t-t') \cdot v(t') dt' = F_{\text{ext}}(t) \iff x(t) = \int_{0}^{t} J(t-t') \left. \frac{dF_{\text{ext}}}{dt'} \right|_{t'} dt'.$$
(1.14)

La fonction  $J(t)^4$  est causale (J(t) = 0 si t < 0) et au même titre que  $\gamma(t)$ , elle contient la mesure de la réponse viscoélastique du milieu pour une géométrie de contact donnée entre l'objet et le milieu. On peut trouver une relation explicite entre les transformées de Laplace  $\hat{\gamma}(s)$  et  $\hat{J}(s)$ . En utilisant les propriétés <sup>5</sup> des transformées de Laplace, les relations de l'équation 1.14 deviennent :

$$\hat{\gamma}(s) = \frac{F(s)}{s\hat{x}(s)} \text{ et } \hat{J}(s) = \frac{\hat{x}(s)}{s\hat{F}(s)} \Longrightarrow \hat{\gamma}(s) = \frac{1}{ms^2\hat{J}(s)}.$$
(1.15)

La réponse  $\hat{x}(s)$  à la force  $\hat{F}(s)$  nous donne la réponse du milieu caractérisé par la fonction  $\hat{J}(s)$  ou  $\hat{\gamma}(s)$ .

#### La mesure de microrhéologie passive

**^** / .

En l'absence de forces extérieures, la particule de taille micrométrique soumise à des forces stochastiques aura un mouvement aléatoire et très irrégulier. En pratique, les différentes positions (x(t), y(t)) de la sonde sont accessibles par un suivi de trajectoire. Afin de quantifier les fluctuations, nous pouvons calculer le déplacement quadratique moyen (*mean square displacement* ou encore *MSD*) de la bille  $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle_t$  dans chaque direction où  $\langle \bullet \rangle_t$  est une moyenne temporelle :

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle_t = \langle (x(t+\tau) - x(t))^2 \rangle_t.$$
(1.16)

La valeur de  $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle_t$  nous permet de quantifier la distance moyenne explorée pendant le temps  $\tau$ . Dans l'annexe A.2 nous démontrons que le spectre des vitesses  $\hat{S}_{\nu}(s)$  de l'équation 1.6 est relié à la transformée de Laplace du déplacement quadratique moyen par la relation :

$$2\hat{S}_{\nu}(s) = s^2 \Delta \hat{x}^2(s). \tag{1.17}$$

#### Combinaison de microrhéologie passive et active et spectre des forces

En combinant les mesures de microrhéologie passive et active, on peut avoir accès au spectre des forces exercées sur la sonde  $\hat{S}_f(s)$ . L'expression 1.6 de  $\hat{S}_f(s)$  s'exprime alors en fonction de  $\Delta \hat{x}^2(s)$  et  $\hat{J}(s)$  d'après les équations 1.17 et 1.15 :

$$\hat{S}_f(s) = \frac{\Delta \hat{x}^2(s)}{2s^2 \hat{J}(s)^2}.$$
(1.18)

<sup>4.</sup> On peut remarquer une similitude entre la définition de J(t) et celle de la fonction de fluage  $\Gamma(t)$  (équation 1.11). Ici, il nous manque un facteur géométrique pour connaître cette fonction donc nous travaillons avec la relation position  $\leftrightarrow$  force plutôt que déformation  $\leftrightarrow$  contrainte. Le formalisme utilisé par la suite, utilisant la fonction J(t), est un calcul rigoureux qui s'affranchit de l'ignorance des conditions de contact.

<sup>5.</sup>  $\mathscr{L}{g'} = s\mathscr{L}{g} - sg(0^+).$ 

La mesure du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  ou de la réponse viscoélastique du milieu J(t) est fortement dépendante de la géométrie des contacts entre la particule et le milieu. De plus, à cause de la complexité d'un milieu tel que la cellule, des anisotropies peuvent apparaître dans les mesures suivant les directions (x et y). Il est donc très important d'effectuer les mesures de  $\Delta x^2(\tau)$  et J(t) **sur un même objet**, autant que possible au même moment et en projetant sur la direction de la force appliquée par l'expérimentateur. Ainsi, cette méthode nous permet de nous affranchir du paramètre géométrique qui est par ailleurs un élément très difficile à estimer.

#### Spectre des forces à l'équilibre et relation de fluctuation-dissipation

Il y a un cas particulier où les forces stochatiques f(t) s'exerçant sur la particule sont composées uniquement des forces thermiques  $f_{th}$ : c'est la situation d'équilibre thermodynamique. Dans ce domaine de la physique statistique à l'équilibre, le **théorème de fluctuation-dissipation** établit que la réponse linéaire d'un système en équilibre à une perturbation extérieure est la même que sa réponse à une fluctuation spontanée. Le mouvement d'une particule micrométrique immergée dans un fluide visqueux newtonien à l'équilibre porte le nom de *mouvement brownien*. Le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  d'une particule brownienne est proportionnel au temps avec un coefficient appelé *constante de diffusion D*, soit  $\Delta x^2(\tau) = 2D\tau$  à une dimension. Albert Einstein en 1905 a été le premier à décrire théoriquement ce mouvement. Il en tira la relation d'Einstein qui relie le coefficient de diffusion D à l'énergie thermique  $k_BT^6$  et à la réponse du milieu  $\gamma$  (aussi appelée friction) :

$$D = \frac{k_B T}{\gamma}.$$
 (1.19)

Cette relation est valable pour les liquides visqueux. On peut généraliser le théorème de fluctuation-dissipation pour un milieu viscoélastique [63]. En multipliant la transformée de Laplace <sup>7</sup> de l'équation 1.1 par la vitesse v(t = 0), en supposant que  $f(t) = f_{th}(t)$ , en négligeant l'inertie ( $s \ll \hat{\gamma}(s)$ ) et en prenant la moyenne d'ensemble  $\langle \bullet \rangle$  on obtient [92] :

$$\langle v(0)\hat{v}(s)\rangle = \frac{m\langle v(0)^2 \rangle + \langle v(0)\hat{f}_{\text{th}}(s)\rangle}{m\hat{\gamma}(s)}.$$
(1.20)

À l'équilibre, la force stochastique d'origine thermique n'est pas corrélée avec la vitesse  $\langle f_{\text{th}}v \rangle = 0$  et le **théorème d'équipartition de l'énergie** montre que pour un mouvement unidirectionnel :

$$\frac{1}{2}m\langle v(0)^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T.$$
(1.21)

De surcroît, une démonstration similaire à l'annexe A.2 permet de voir que  $2\langle v(0)\hat{v}(s)\rangle = s^2 \Delta \hat{x}^2(s)$ . On obtient la relation d'Einstein généralisée à un milieu viscoélastique de fonc-

<sup>6.</sup>  $k_B = 1,381 \ 10^{-23} \text{ J/K}$  est la constante de Boltzmann.

<sup>7.</sup> En utilisant la propriété sur les transformée de Laplace des dérivées :  $\mathscr{L}\{g'\} = s\mathscr{L}\{g\} - sg(0^+)$ .

tion de réponse  $\gamma(t)$  ou de façon équivalente J(t) dans une direction ( $\perp$  ou  $\parallel$ ) :

$$\Delta \hat{x}_{eq}^2(s) = \frac{2k_B T}{m s^2 \hat{\gamma}(s)} = 2k_B T \hat{J}(s) \Longleftrightarrow \Delta x_{eq}^2(\tau) = 2k_B T J(\tau).$$
(1.22)

Le théorème de fluctuation-dissipation montre une propriété remarquable des systèmes viscoélastiques à l'équilibre : le déplacement quadratique moyen  $\Delta x_{eq}^2(\tau)$  accessible par une expérience de microrhéologie passive est directement relié à la fonction de réponse  $J(\tau)$ du système. On peut aussi définir avec la relation 1.18 le spectre des forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  ou spectre des forces thermiques :

$$\hat{S}_{feq}(s) = \frac{k_B T}{s^2 \hat{J}(s)}.$$
(1.23)

Ainsi la mesure de J(s) seule nous permet de calculer, en connaissant la température du milieu, le spectre des forces thermiques. Nous allons utiliser cela pour définir un indice d'écart à l'équilibre thermodynamique d'un système hors-équilibre.

#### Mesure de l'écart à l'équilibre d'un système viscoélastique hors-équilibre

Dans le cas d'un système hors-équilibre, nous pouvons faire une analogie avec l'équation 1.23 du spectre des forces thermiques et définir formellement une température effective  $T_{\text{eff}}$  qui dépend de la fréquence pour écrire le spectre des forces :

$$\hat{S}_f(s) = \frac{k_B T_{\text{eff}}(s)}{s^2 \hat{f}(s)} = \frac{\Delta \hat{x}^2(s)}{2s^2 \hat{f}(s)^2}.$$
(1.24)

La mesure de la fonction de réponse J(t) avec la technique de microrhéologie active nous donne la contribution des forces d'origine thermique s'exerçant sur la particule. De plus si on ajoute la mesure de microrhéologie passive, nous avons accès à toutes les forces s'appliquant sur la sonde. En faisant le rapport des deux spectres de force  $\hat{S}_f(s)$  et  $\hat{S}_{feq}(s)$ on définit l'indice  $\theta(s)$  d'écart à l'équilibre :

$$\theta(s) = \frac{\hat{S}_f(s)}{\hat{S}_{feq}(s)} = \frac{T_{eff}(s)}{T}.$$
(1.25)

Si l'indice  $\theta(s) = 1$  alors les forces agissant sur l'objet sont d'origine thermique, on dit que le système est à l'équilibre thermodynamique. Si  $\theta(s) > 1$  alors ces forces peuvent avoir deux contributions, l'une thermique, et l'autre non-thermique due à l'activité biologique menant le système en dehors de l'équilibre.

#### 1.3 La microrhéologie de la cellule eucaryote

#### 1.3.1 Origines

Bien que les études de microrhéologie cellulaire et tissulaire aient beaucoup progressé ces dix dernières années, les premières mesures sur des tissus datent du XIX<sup>e</sup> siècle. En

1847, Guillaume Wertheim publiait un mémoire sur l'élasticité des tissus du corps humain [119]. Il y remarquait que si on les rangeait suivant leur élasticité croissante on obtenait l'ordre suivant : os, tendons, nerfs, muscles, veines, artères [91]. Au début des années vingt, Alfred Heilbronn développait la première technique de microrhéologie cellulaire en insérant des particules magnétiques dans des protoplasmes et en observant leurs mouvements dans un champ magnétique [115, 44]. En 1950, Crick utilisait la même méthode pour mesurer la viscoélasticité du cytoplasme de fibroblastes [23, 22]. Maintenant il existe de nombreuses techniques bien décrites dans plus d'une dizaine de revues [118, 46, 4, 58, 92, 20, 112, 122, 108, 17, 121].

#### 1.3.2 Les techniques expérimentales de microrhéologie

Dans les années 2000, les recherches ont évolué et ont vu apparaître de nouvelles techniques expérimentales permettant de sonder la rhéologie globale ou locale d'une cellule. Elles utilisent des sondes attachées spécifiquement ou non au cytosquelette. Pour coupler spécifiquement une sonde au cytosquelette, différents ligands recouvrent celle-ci et peuvent cibler des structures particulières de la cellule. Par exemple, des microbilles sont enduites de peptides ou d'anticorps se liant chimiquement aux intégrines [113] ou aux cadhérines [78] à travers la membrane. Ainsi, par l'intermédiaire de ces protéines transmembranaires, la bille sera reliée physiquement au cytosquelette. Ces sondes peuvent être extracellulaires mais aussi intracellulaires. Par exemple, il est possible d'injecter directement des billes fluorescentes d'une taille de quelques centaines de nanomètres directement dans le cytoplasme [107, 38]. Des sondes biologiques sont utilisées comme des phagosomes [31, 9, 25], des granules présents naturellement dans la cellule [117, 123, 124] ou des endosomes magnétiques [120, 83]. L'observation de leur déplacement à l'application d'une force nous donne des indications sur la déformation du matériau. Quand ces forces sont exercées par l'expérimentateur on parle de microrhéologie active, quand elles sont intrinsèques à la cellule on parle de microrhéologie passive.

Pour la microrhéologie active (figure 1.13), les forces peuvent être générées sur des sondes magnétiques (billes, phagosomes et endosomes magnétiques) en utilisant un champ magnétique (pinces magnétiques [10], magnétocytométrie [62, 113, 30]) ou sur des sondes diélectriques (billes, granules) en focalisant une onde électromagnétique émise par un laser (pinces optiques). On peut également exercer des forces d'origine mécanique sur les cellules par aspiration (micropipettes [45]), avec un microlevier (microscopes à force atomique [106]) ou avec des microplaques [26]. Les grandeurs viscoélastiques déduites de la mesure active dépendent du type de régime <sup>8</sup>. Une mesure en régime sinusoïdal, où un déplacement oscillant est imposé à la sonde impliquant une déformation périodique du milieu, permettra d'estimer le module viscoélastique  $G(\omega)$ . Une mesure en régime de fluage, où une force constante est exercée sur la sonde, imposant une contrainte constante au mi-

<sup>8.</sup> On reste bien sûr dans le cas de petites déformations et de régimes linéaires.

lieu, donnera accès à la fonction de fluage  $\Gamma(t)^9$ .

La microrhéologie passive (figure 1.14) peut, en faisant l'hypothèse que le milieu est à l'équilibre, calculer les grandeurs  $\Gamma(t)$  et  $G(\omega)$  (partie 1.2.2). Mais, comme on l'a vu, le cytosquelette d'une cellule est capable de générer des forces d'origine biochimique. Enfin, des techniques de microrhéologie passive à deux points [24] ont été développées pour s'affranchir du couplage entre la sonde et le milieu et de ses hétérogénéités locales. Cette fois ce n'est plus la fonction d'autocorrélation <sup>10</sup> de la position d'une particule qui est calculée mais la corrélation entre deux particules.

#### 1.3.3 Un comportement en loi de puissance

Il est très difficile de comparer les résultats de microrhéologie cellulaire de toutes les méthodes expérimentales. Le calcul des grandeurs viscoélastiques est dépendant de la sonde utilisée et du couplage entre la cellule et la sonde. Une cellule vivante est un matériau très hétérogène, actif et son comportement dépend d'une multitude de paramètres plus ou moins contrôlables. De plus, différents laboratoires utilisent différents types cellulaires et sondent chacun différentes parties de la cellule. Néanmoins, ont été observés des comportements généraux pour les modules viscoélastiques  $G(\omega)$  et les fonctions de fluage  $\Gamma(t)$ .

Des modèles simples, dérivés du modèle de Maxwell ou de Kelvin-Voigt, reposant sur l'association de ressorts et d'amortisseurs visqueux ont été utilisés pendant longtemps pour décrire la mécanique cellulaire. Le comportement élastique de la cellule était alors attribué aux filaments du cytosquelette alors que le cytosol contribuait plutôt au comportement visqueux. Ces modèles signifient que la cellule a un nombre fini de temps de relaxation. Toutefois, les progrès techniques ont permis d'accéder à une meilleure résolution temporelle et cette vision des systèmes, ayant un nombre fini de temps de relaxation, a été mise en défaut [26] (figures 1.15a et 1.15c). En effet, il est maintenant bien établi que la fonction de fluage  $\Gamma(t)$  et le module viscoélastique  $G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$  se comportent comme des lois de puissance respectivement du temps et de la fréquence <sup>11</sup> :

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{\beta},\tag{1.26}$$

$$G'(\omega) = G'_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{\beta}$$
 et  $G''(\omega) = G''_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{\beta}$ . (1.27)

<sup>9.</sup> Des hypothèses géométriques sont nécessaires car les grandeurs  $G(\omega)$  et  $\Gamma(t)$  effectuent le lien entre la contrainte et la déformation et non entre la force et le déplacement. Pour les sondes locales extracellulaires, il est nécessaire de connaître le degré d'enfoncement, pour les sondes locales intracellulaires il faut connaître le couplage sonde-milieu.

<sup>10.</sup> La fonction d'autocorrélation  $R_x(\tau)$  est reliée au déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle : \langle \Delta x^2(\tau) \rangle = 2(R_x(0) - R_x(\tau))$  où  $R_x(\tau) = \langle x(t+\tau)x(t) \rangle_t - \langle x(t) \rangle_t^2$ .

<sup>11.</sup> Les fonctions de réponse J(t) et  $\gamma(t)$  (1.2.2) reliées à  $\Gamma(t)$  par l'intermédiaire d'un coefficient géométrique suivent aussi une loi de puissance :  $J(t) = J_0 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{\beta}$ .



FIGURE 1.13 – Schéma des différentes techniques de microrhéologie active (adapté de [46]).



**FIGURE 1.14** – Schéma des différentes techniques de microrhéologie passive. Notons que si les sondes en présence sont magnétiques ou diélectriques, ces systèmes peuvent être adaptés à la microrhéologie active (adapté de [46]).
Il est important de noter que d'après l'équation 1.12 ces deux grandeurs sont équivalentes,

si 
$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{\beta}$$
 alors  $|G(\omega)| = \frac{t_0^{\beta}}{\Gamma_0 \phi(1+\beta)} \omega^{\beta}$ , (1.28)

où  $\phi(1+\beta) = \int_0^\infty e^{-x} x^\beta dx$  est la fonction d'Euler [7]. Le cas où  $\beta = 1$  signifie que le matériau a un comportement purement visqueux,  $\beta = 0$  un comportement élastique. Si  $0 < \beta < 1$  la réponse du matériau est viscoélastique.

Le travail effectué par Balland *et al.* [26] tente de trouver un comportement général en comparant deux expériences de microrhéologie différentes sur des cellules identiques. Il est alors trouvé un même exposant  $\beta \approx 0.2$  (figure 1.15e) entre la fonction de fluage mesurée avec des microplaques et le module viscoélastique mesuré à l'aide d'une pince optique faisant osciller la position d'une bille attachée spécifiquement à l'actine. Ce comportement en loi de puissance est interprété comme un assemblage infini de modèles de Kelvin-Voigt qui confère à la cellule une infinité de temps de relaxation (figure 1.15f).



**FIGURE 1.15** – Mesure de la fonction de fluage obtenue par étirement uniaxial d'une cellule grâce à des microplaques. Figures a et c : modèle simple (figure c) associant plusieurs ressorts et amortisseurs visqueux. La fonction de fluage correspondant à ce modèle est tracée sur la figure a. Le modèle semble s'ajuster parfaitement sur la figure a mais lorsqu'on étudie plus finement le comportement grâce aux échelles logarithmes (figure d) on voit une déviation aux temps courts (adapté de [26, 7]). Figures b et e : ajustement de la fonction de fluage avec une loi de puissance en échelle linéaire (figure b) et en échelle logarithme. On voit que cette fois le comportement de la fonction de fluage est bien décrit à toutes les échelles de temps par une loi de puissance. Figure f : modèle expliquant le comportement en loi de puissance par un assemblage infini en série de modèles de Kelvin-Voigt. (adapté de [26, 7]).

Une comparaison plus complète des différences entre les expériences de microrhéologie a été menée par Hoffman *et al.* [48]. Ils trouvent, en comparant toutes les méthodes citées précédemment (figures 1.13 et 1.14), que les exposants  $\beta$  se regroupent autour de deux intervalles distincts  $\beta_1 \in [0.24 - 0.29]$  et  $\beta_2 \in [0.13 - 0.17]$ . Ils interprètent cela en remarquant que toutes les données des sondes intracellulaires peuvent, après renormalisation, se confondre avec une fonction de puissance  $\beta_1$  alors que pour la mesure extracellulaire la loi de puissance est  $\beta_2$  (figure 1.16 gauche). L'exposant  $\beta_2$  serait une signature de l'actine corticale qui est un réseau dense sous-membranaire réticulé. L'exposant  $\beta_1$  correspond à une réponse de l'espace intracellulaire qui est plus fluide que l'actine corticale dans laquelle la réticulation lui confère un comportement plus élastique. En les comparant avec la littérature, Hoffman *et al.* observent ce comportement pour d'autres techniques de microrhéologie passive et en tirer la valeur du module viscoélastique, ils s'affranchissent des forces biologiques en appauvrissant l'ATP de la cellule. Très peu d'estimations de ces forces biologiques ont été effectuées jusqu'à maintenant, nous proposons dans la partie suivante de présenter ces mesures.



**FIGURE 1.16** – Comparaison de la dépendance fréquentielle du module viscoélastique pour différentes techniques. Le module viscoélastique  $|G(\omega)|$  peut suivre deux lois de puissance  $\beta_1$  ou  $\beta_2$ . Aux hautes fréquences  $|G(\omega)| \sim \omega^{0,75}$  est la réponse typique d'un gel de polymères d'actine réticulés [73]. Les mesures de microrhéologie passive de la figure a sont faites sur des cellules appauvries en ATP permettant d'enlever les contributions des forces d'origine biologique. (adapté de [46, 48]).

### 1.3.4 État de l'art de la mesure de spectre des forces actives et de la violation du théorème de fluctuation-dissipation

Le seul moyen de caractériser l'activité des forces biologiques dans la cellule est d'utiliser les deux approches de microrhéologie : l'active qui mesure le déplacement d'une sonde induite par une force extérieure et la microrhéologie passive qui mesure les fluctuations d'une particule soumise aux forces d'origine biologique et thermique. L'approche active nous permet de mesurer la part des forces thermiques s'exerçant sur la sonde et la combinaison des deux techniques de microrhéologie nous donne l'ensemble des forces la faisant fluctuer.

#### Mesure du spectre des forces hors-équilibre

#### Loi de puissance du déplacement quadratique moyen

Le comportement en loi de puissance de la réponse mécanique d'un matériau à l'équilibre implique que le déplacement quadratique moyen d'une particule dans ce milieu soit aussi une loi de puissance (équation 1.22),

si 
$$J(\tau) = J_0 \left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{\beta}$$
 alors  $\langle \Delta x_{eq}^2(\tau) \rangle = 2k_B T J_0 \left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{\beta}$ . (1.29)

Le déplacement quadratique moyen d'une sonde dans un liquide visqueux à l'équilibre est une fonction linéaire du temps, on parle de mouvement **diffusif** :  $\langle \Delta x_{eq}^2(\tau) \rangle \sim \tau^1$  ce qui correspond à  $J(\tau) \sim \tau^1$ . Pour une sonde plongée dans un milieu élastique, le déplacement quadratique moyen est une constante :  $\langle \Delta x_{eq}^2(\tau) \rangle \sim \tau^0$  ce qui correspond à  $J(\tau) = \text{cst.}$  Le déplacement quadratique moyen d'une sonde dans un milieu viscoélastique à l'équilibre sera le cas intermédiaire où  $\langle \Delta x_{eq}^2(\tau) \rangle \sim \tau^{\alpha}$  avec  $0 < \alpha < 1$ , on parle alors de mouvement **sous-diffusif**. Il en résulte que si  $\alpha > 1$ , le matériau ne peut pas être à l'équilibre, on parle de mouvement **sur-diffusif**. Le cas limite  $\alpha = 2$  est un mouvement ballistique.

#### Dépendance fréquentielle du spectre des forces

Lau *et al.* [55] ont été les premiers à comparer les mesures de microrhéologie active et passive. Ils ont comparé les mesures des fluctuations de billes phagocytées dans des cellules épithéliales cancéreuses F9 et des macrophages J774A de Caspi *et al.* [16] et les mesures de microrhéologie active de Fabry *et al.* [28] sur le même type cellulaire. Le déplacement quadratique moyen des sondes a un comportement sur-diffusif  $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle \sim \tau^{1.5}$  (figure 1.17 gauche) qui est la signature d'un système hors de l'équilibre thermodynamique. Fabry *et al.* ont utilisé un champ magnétique pour appliquer un couple (magnétocytométrie) sur une microbille ferrimagnétique recouverte de RGD et attachée au cytosquelette *via* les intégrines. Ce couple se traduit par un déplacement de la bille qui induit une déformation périodique du milieu en contact avec la bille. Ils peuvent ainsi calculer le module visco-

élastique  $G(\omega)$  de la cellule. En utilisant une expression similaire <sup>12</sup> à l'équation 1.18, Lau *et al.* trouvent que le spectre des forces s'exerçant dans la cellule est une loi de puissance  $\hat{S}_f(s) \sim s^{-2}$ . Cette valeur de l'exposant a été interprétée comme le spectre d'un créneau de force.

D'après l'équation 1.18, pour un comportement en loi de puissance de la réponse de  $J(\tau) \sim \tau^{\beta}$  et du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau) \sim \tau^{\alpha}$  on s'attend à un comportement en loi de puissance du spectre des forces <sup>13</sup>:

$$\hat{S}_f(s) = \frac{\Delta \hat{x}^2(s)}{2s^2 \hat{J}(s)^2} \sim s^{2\beta - \alpha - 1} \sim s^{\lambda}.$$
(1.30)

Selon la découverte de Lau *et al.*,  $\lambda = -2$ , on aurait une relation directe :  $\alpha = 2\beta + 1$ . En fait ce résultat est critiquable car les deux mesures sont prises à deux endroits de la cellule (intracellulaire pour la mesure passive et extracellulaire pour la mesure active).



**FIGURE 1.17** – À gauche, déplacement quadratique moyen d'un couple de billes phagocytées (microrhéologie à deux points) dans des cellules épithéliales cancéreuses F9 et des macrophages J774A [16]. Cette fonction suit la loi de puissance  $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle \sim \tau^{1.5}$ . Ce comportement sur-diffusif (exposant plus grand que 1) indique un effet des forces non-thermiques. À droite, la mesure active de Fabry *et al.* [28] de magnétocytométrie, permet de tracer le spectre des forces thermiques (droite en pointillé) s'exerçant dans les cellules F9 et J774A. Cette même mesure, couplée aux mesures des fluctuations de la figure de gauche permet de tracer le spectre des forces actives et thermiques s'exerçant dans ces cellules. (adapté de [55]).

Le travail de Bursac *et al.* [14] tente de vérifier cette relation en sondant l'actine corticale avec des microbilles ferrimagnétiques recouvertes de RGD. Bursac *et al.* utilisent

<sup>12.</sup> L'expression est  $S_f(\omega) \approx 6\pi a |G(\omega)|^2 C(\omega)$  où  $C(\omega)$  est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la position.  $C(\omega)$  est reliée au déplacement quadratique moyen. L'utilisation de  $C(\omega)$  leur permet de rester en transformée de Fourier, chose intéressante car  $G(\omega)$  est calculée directement dans l'espace fréquentiel de Fourier.

<sup>13.</sup> Une loi de puissance dans l'espace temporel implique une loi de puissance dans l'espace fréquentiel donc si  $J(t) = A(\frac{t}{t_0})^{\beta}$  alors sa transformée de Laplace est de la forme  $\hat{J}(s) = A\Gamma(1+\beta)(\frac{s}{s_0})^{-1-\beta}$ .

ces sondes pour l'approche active et passive sans toutefois faire les deux mesures de rhéologie exactement sur le même objet. Ils calculent le déplacement quadratique moyen des sondes pour des cellules soumises à différentes drogues capables d'inhiber certains processus biologiques ainsi qu'à différentes températures (figure 1.18A). Ils utilisent : le DBcAMP, drogue diminuant la contractilité cellulaire, le jasplakinolide qui stabilise l'actine, ils appauvrissent la cellule en ATP et font des mesures à 23°C, 37°C et 41°C. Les fluctuations des billes oscillent entre des périodes de confinement et des périodes de mouvement dirigé. Il en résulte l'existence de deux régimes : aux temps courts, le déplacement quadratique moyen a un comportement sous-diffusif, aux temps longs il a un comportement sur-diffusif. Ces deux régimes existent quel que soit le processus biologique inhibé par les drogues. En outre, ces drogues ont un effet sur l'amplitude des fluctuations. Sur la figure 1.18B, Bursac et al. ont tracé l'exposant local<sup>14</sup> du déplacement quadratique moyen pour les cellules de contrôle à 23°C et pour les cellules appauvries en ATP. De plus, la mesure active de magnétocytométrie  $G(\omega)$  permet de calculer<sup>15</sup> le déplacement quadratique moyen prédit à l'équilibre via le théorème de fluctuation-dissipation. Ils comparent donc les exposants prédits à l'équilibre et ceux réellement mesurés (figure 1.18B), ce qui permet de faire une première estimation de l'écart à l'équilibre. Aux temps courts, ces mesures approchent l'équilibre mais aux temps longs elles divergent par rapport aux prédictions du théorème de fluctuation-dissipation. La carence en ATP maintient le système à l'équilibre sur des temps plus longs.

Enfin, sur la figure 1.18C, la prédiction de Lau *et al.* qui lie les exposants  $\Delta x^2(\tau) \sim \tau^{\alpha}$  et  $J(\tau) \sim \tau^{\beta}$  est vérifiée. Seulement, les couples de points ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) ne s'alignent pas sur la droite  $\alpha = 2\beta + 1$ , suggérant une autre valeur de l'exposant du spectre des forces  $\lambda = 2.5$  au lieu de 2. Les deux études de Lau *et al.* et Bursac *et al.* ont le défaut d'utiliser des sondes différentes, aucune conclusion ne peut en être tirée quant à l'amplitude des fluctuations des forces.

#### Mesure de l'amplitude du spectre des forces

#### Activité des gels d'acto-myosines

L'intérêt de l'étude des forces actives des cellules est de comprendre le rôle et le comportement des moteurs moléculaires. Au lieu de travailler sur des organismes cellulaires complexes, il peut être enrichissant afin de mieux les comprendre, d'observer le comportement de modèles simples tels que les gels d'actines. Ces gels peuvent être rendus actifs par ajout de myosines II et cette activité est contrôlée par la présence ou l'absence d'ATP. Mizumo *et al.* [68] mesurent les propriétés mécaniques d'un gel actif d'actine à l'aide de billes magnétiques dont ils enregistrent ensuite les fluctuations. Ils peuvent ainsi comparer <sup>16</sup> les

<sup>14.</sup> L'exposant local est la pente locale en échelle logarithme-logarithme.

<sup>15.</sup>  $\Delta x^2(\tau) = \mathscr{F}^{-1}\left(\frac{2k_BT}{ai\omega G(\omega)}\right)$  où  $\mathscr{F}^{-1}$  désigne la transformée de Fourier inverse.

<sup>16.</sup> Dans cet article [68], la partie imaginaire de la fonction de réponse du gel actif  $\alpha''$  est comparée au terme  $\frac{\omega C(\omega)}{2k_BT}$  où  $C(\omega)$  est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la position de la particule. Dans ce cas le théorème de fluctuation-dissipation s'écrit  $\alpha'' = \frac{\omega}{2k_BT}C_{eq}(\omega)$ .



**FIGURE 1.18** – Courbes : 22°C (vert), 37°C (orange), 41°C (violet), DBcAMP (bleu), Jasplakinolide (rouge), *ATP depletion* (noir). Figure A : déplacement quadratique moyen de billes-RGD attachées au cytosquelette par l'intermédiaire des intégrines. Figure B : exposant du déplacement quadratique moyen en fonction du temps  $\Delta t$  (rond) et exposant de la prédiction de celui-ci par le théorème de fluctuation-dissipation (carré). Figure C : exposant  $\alpha$  en fonction de  $\beta$  + 1 pour vérifier la relation de Lau *et al.* ( $\alpha = 2\beta + 1$  [14]).

deux mesures à l'aide du théorème de fluctuation-dissipation. Sur la figure 1.19A, la partie imaginaire de la fonction de réponse est confondue avec la fonction de corrélation des fluctuations, le gel est à l'équilibre. Mais, cinq heures plus tard (figure 1.19B), une différence entre les mesures actives et passives est observée <sup>17</sup>, le système s'écarte de l'équilibre aux temps longs ( $\omega > 10$  Hz). Au-delà de cette fréquence le système apparaît figé par rapport à la durée du cycle des myosines et donc on n'observe pas d'écart à l'équilibre.

#### Activité dans le cytoplasme

La première étude de spectre de l'amplitude du spectre des forces dans une cellule en utilisant exactement la même sonde a été effectuée par Robert et Wilhelm *et al.* [83]. Ils ont

<sup>17.</sup> On peut émettre l'hypothèse que le retard de 5 h est le temps nécessaire pour que le gel s'organise complètement.



**FIGURE 1.19** – Figure A : comparaison des mesures actives  $\alpha''$  et passives  $\frac{\omega C(\omega)}{2k_BT}$  pour un gel d'actine et de myosine. Au début de l'expérience les deux courbes se superposent, symptôme d'un système à l'équilibre. Figure B : Même chose que la figure A, cinq heures plus tard. Au-dessous de 10Hz les contributions des myosines sont observables et le gel se retrouve hors de l'équilibre thermodynamique. (d'après [68]).

quantifié le spectre des forces actives sur des endosomes magnétiques (figure 1.20 droite). La particularité de leur expérience est de faire à la suite la mesure de microrhéologie passive puis active. Ceci permet de s'affranchir de l'hétérogénéité et des disparités dans la cellule. Le déplacement quadratique moyen mesuré sur des cellules saines montre un comportement sur-diffusif sur l'échelle de temps de 0.1 - 10s (figure 1.20A) et le spectre des forces actives est largement au-dessus de celui à l'équilibre calculé à l'aide de la mesure de microrhéologie active. Il s'agit ensuite d'identifier les processus biologiques à l'origine des forces actives. Pour cela, des cellules sont droguées avec du nocodazole, qui dépolymérise les microtubules ce qui permet d'étudier leur rôle dans la génération de force. En effet, les endosomes sont connus pour avoir un mouvement dirigé le long des microtubules à l'aide de moteurs moléculaires, les kinésines et les dynéines. Le déplacement quadratique moyen s'en trouve largement modifié et se rapproche de celui calculé à l'équilibre (figure 1.20B). Le système est alors proche de l'équilibre thermodynamique (figure 1.20 gauche). Dans un deuxième temps, Robert et al. mesurent le rôle des filaments d'actine en les dépolymérisant avec de la latrunculine A. L'utilisation de cette drogue n'a pas un effet important sur l'amplitude des fluctuations de la sonde (figure 1.20C) qui est encore largement surdiffusive. Mais la combinaison des mesures actives et passives montre que le spectre des forces se rapproche de celui à l'équilibre. Ceci montre l'importance de la double mesure active-passive, car la dépolymérisation de l'actine a un effet à la fois sur le mouvement de la sonde et sur la viscoélasticité de la cellule et donc sur le spectre des forces thermiques. Pour déterminer les acteurs biologiques responsables des forces en utilisant des drogues et ainsi mesurer si le système se trouve ou non à l'équilibre, il est nécessaire de connaître l'amplitude des fluctuations et la viscoélasticité du milieu dans lequel baigne la sonde.



**FIGURE 1.20** – À gauche : En traits pleins, le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  des chaines d'endosomes. En traits pointillé, le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2_{eq}(\tau)$  calculé en utilisant le théorème de fluctuation-dissipation à partir de la mesure active. La courbe A correspond à des cellules de contrôles avec un cytosquelette intact. Sur la courbe B, les mesures ont été effectuées sur des cellules droguées avec du nocodazole. Le nocodazole permet de dépolymériser les microtubules. Sur la courbe C, les cellules sont droguées avec de la latrunculine A qui dépolymérise les filaments d'actine. À droite, le spectre des forces  $\hat{S}_f$  calculé à partir des deux approches de microrhéologie. En pointillé, le spectre des forces  $\hat{S}_{feq}$  calculé *via* la microrhéologie active en faisant l'hypothèse que le système est à l'équilibre. D'après [83].

# CHAPITRE **2**

# Dispositif expérimental et méthodes

# Sommaire

2.1	Approche expérimentale			
2.2	Pince optique			
	2.2.1	Histoire et principe	1	
2.3	Montage expérimental			
	2.3.1	Montage de la pince optique	3	
	2.3.2	Cale piézoélectrique    43	3	
	2.3.3	Calibration du piège optique	5	
	2.3.4	Échantillon expérimental	)	
2.4	Acqu	isition d'images et détection de particules 50	)	
	2.4.1	Caméra rapide	)	
	2.4.2	Détection de particules	1	
	2.4.3	Limitations expérimentales	2	
2.5	Calcu	Il des transformées de Laplace	ł	
2.6	Calcu	Il des moyennes et des erreurs statistiques 54	ł	



# 2.1 Approche expérimentale

**FIGURE 2.1** – À gauche, photo d'une cellule C2C12 sur laquelle sont attachées des billes de silice couvertes de RGD. À droite, schéma simplifié de la géométrie du contact entre la bille et l'actine corticale.

Le but de ce travail est d'étudier les forces stochastiques d'origine bio-chimique s'exerçant dans le réseau d'actine sous-membranaire. Nous avons choisi de travailler avec des cellules musculaires connues pour leur activité provenant de moteurs moléculaires. En effet, les cellules myoblastes C2C12 (figure 2.1 gauche) vont se différencier en myotubes dans lesquels l'activité des myosines II génère la contraction musculaire. Ces cellules seront étudiées en position d'étalement sur un substrat recouvert de fibronectine (partie 2.3.4).

Pour extraire ces informations du cytosquelette, nous avons besoin d'une sonde. Nous utilisons une bille de silice de 1.56  $\mu$ m de diamètre préalablement recouverte de RGD (partie 2.3.4). Celle-ci va se lier au réseau d'actine corticale par l'intermédiaire des protéines transmembranaires : les intégrines (figure 2.1 droite).

Les fluctuations de la bille rendent compte des mouvements du réseau d'actine sousmembranaire. Il est possible de suivre la trajectoire de la bille avec un microscope et une caméra rapide, et d'exercer sur elle des forces à l'aide d'une pince optique. On a accès aux déplacements de la bille sur seulement deux dimensions (x et y) correspondant au plan du substrat. Au demeurant, les déplacements dans la troisième dimension sont très limités, une cellule étalée sur un substrat étant beaucoup plus grande dans les dimensions parallèles au substrat que dans la dimension perpendiculaire. De plus, les billes placées au dessus du noyeau sont exclues de l'étude. À cet endroit, la surface de la cellule n'est pas du tout plane et un petit déplacement suivant les axes parallèles au substrat entraine une variation d'altitude qui altère la qualité de l'image par défocalisation. Les positions de la bille pour chaque film sont déduites des enregistrements en utilisant un algorithme de suivi de particule (partie 2.4.2). Pour exercer des forces sur les sondes et mesurer la réponse du milieu cellulaire, nous utilisons une pince optique (partie 2.2). En effet, une bille de silice est diélectrique et peut donc être piégée par un laser.

On peut donc à la fois sonder l'activité du cytosquelette grâce aux mouvements spontanés de la bille et, en exerçant des forces, caractériser les propriétés mécaniques de la zone cellulaire en contact avec la bille.

## 2.2 Pince optique

La pince optique est un outil très utilisé en biologie et en physique qui permet d'exercer des forces de l'ordre du piconewton sur des objets diélectriques microscopiques. Elle rend possible la manipulation d'objets de l'ordre du micromètre tels que les bactéries ou les cellules. Avec une résolution de l'ordre de 0.1 pN [41], les pinces optiques permettent de mesurer les forces générées par certains moteurs moléculaires tels que les myosines II [33], les kinésines [101], les dynéines [40] ou encore les ARN polymérases [105].

#### 2.2.1 Histoire et principe

La lumière est une onde électromagnétique de vecteur d'onde  $\vec{k}$  qui peut agir sur la matière. Elle transfère de l'énergie E = hv à la matière sous forme de quantas appelés *photons*. Ces *photons* sont susceptibles de transmettre leurs quantités de mouvement  $\vec{p} = \hbar \vec{k}$  à des atomes par des phénomènes de diffusion élastique. La réémission des photons absorbés par l'atome n'a aucune direction privilégiée. Par conservation de la quantité de mouvement du système *atome-photon*, on comprend que les *photons* peuvent exercer des forces dans la direction de l'onde incidente sur l'atome : il s'agit de la *pression de radiation*. C'est en utilisant cette force et en combinant plusieurs lasers que Chu *et al.* ont réussi en 1985 à confiner et refroidir un nuage d'atomes de sodium [19].

En 1986, Ashkin montre qu'il est possible de piéger des particules diélectriques d'une taille comprise entre 25 nm et 10  $\mu$ m [5] en focalisant un seul faisceau laser gaussien. Dans ce cas, l'objet est soumis à deux types de forces de la part de la lumière : la pression de radiation décrite précédemment qui exerce une force dans la direction du faisceau incident et la force de gradient.

#### La force de gradient

Un objet est dit diélectrique s'il ne conduit pas le courant électrique. Cependant, au niveau microscopique, les atomes composant le diélectrique présentent des charges positives et négatives se réorganisant sous l'action d'un champ électrique. Des dipôles électriques vont alors se former et s'aligner sur le champ électrique créant un champ électrique interne au diélectrique : c'est le phénomène de *polarisation*<sup>1</sup>. Le champ électrique créé par

<sup>1.</sup> La polarisation est la capacité d'un diélectrique à former des dipôles orientés sous l'effet d'un champ électrique. Le vecteur polarisation  $\vec{P} = \varepsilon_0 \chi \vec{E}$  où  $\vec{E}$  est le champ électrique,  $\chi$  est la susceptibilité électrique (sans dimension) et  $\varepsilon_0$  est la permittivité du vide.

la polarisation d'une sphère diélectrique dans le vide est comparable à celui d'un dipôle électrique de charges  $\{+Q, -Q\}$ . En pratique, la sphère est elle-même plongée dans un milieu matériel lui aussi diélectrique qui est un milieu aqueux dans le cas usuel des pinces optiques. Il faut ainsi prendre en considération la polarisation du milieu par le champ électrique. Des charges  $Q_m$  vont s'accumuler dans le milieu aux bords de la sphère diélectrique (figure 2.2A) de signe contraire aux charges Q, il faut donc considérer le dipôle électrique de charge :

$$\{+Q_{\text{total}}, -Q_{\text{total}}\}$$
 avec  $Q_{\text{total}} = Q - Q_m.$  (2.1)

La force exercée par un champ électrique extérieur  $\vec{E}$  sur un corps chargé électriquement de charge  $Q_{\text{total}}$  est appelée la force de Coulomb  $\vec{F_c} = Q_{\text{total}}\vec{E}$ . Pour un champ électrique uniforme  $\vec{E_0}$ , la force de Coulomb exercée sur une sphère diélectrique est nulle. Si le champ électrique extérieur est non-uniforme, la force de Coulomb s'exerçant sur l'ensemble du corps chargé n'est plus nulle. On peut montrer que dans le régime Rayleigh ( $d \ll \lambda$  où d est le diamètre de la sphère et  $\lambda$  est la longueur d'onde du champ), cette force est proportionelle au gradient de  $\vec{E}$ ,  $\vec{F}_{\text{grad}} = (\vec{p}.\vec{\nabla})\vec{E}$ , où  $\vec{p}$  est le moment dipolaire. Dans le cas particulier où  $\vec{E} = E(x)\vec{u}_x$ 

$$\vec{F}_{\text{grad}} \sim Q_{\text{total}} d\vec{\nabla} E(x).$$
 (2.2)

La force de gradient  $\vec{F}_{\text{grad}}$  est dans le même sens que le gradient et dépend du signe de  $Q_{\text{total}}$ . Il en résulte que si  $Q > Q_m$  alors la particule se dirigera vers les champs forts, et inversement. Pour attirer la sphère diélectrique vers les champs forts, il faut qu'elle soit plus polarisable que le milieu environnant. Cela revient à dire qu'il est nécessaire que l'indice de réfraction de la sphère diélectrique soit plus grand que celui du milieu<sup>2</sup>. En calculant la force moyenne sur une période temporelle du champ, on peut montrer que

$$F_{\rm grad} \sim \nabla E^2 \sim \nabla I,$$
 (2.3)

où *I* est l'intensité lumineuse du faisceau incident. Pour un faisceau gaussien à la longueur d'onde  $\lambda$  focalisé par un objectif d'ouverture numérique *NA*, on a au plan de focalisation  $I(\Delta r) \sim \exp(-2\Delta r^2/\omega_0^2)$  avec  $\omega_0 = 1.22\lambda/(2NA)$  ce qui implique que :

$$F_{\rm grad} \sim -\Delta r e^{\frac{-2\Delta r^2}{\omega_0^2}},$$
 (2.4)

où  $\Delta r$  est la distance au centre du point de focalisation. Près du centre (au petit  $\Delta r$ ) on peut écrire que le piège optique se comporte comme un ressort linéaire :

$$F_{\rm grad} \sim -k\Delta r.$$
 (2.5)

#### Piège optique dans les trois dimensions

Un objet diélectrique va subir deux types de forces de la part de la lumière, la pression de radiation et la force de gradient. Seule cette dernière permet de piéger un objet dans les

<sup>2.</sup> L'indice de réfraction *n* est une grandeur reliée à la susceptibilité électrique :  $n = \sqrt{1 + \Re e(\chi)}$ .

trois dimensions. Il faut donc que la force de gradient domine la pression de radiation. En pratique, un faisceau gaussien fortement focalisé par un objectif de microscope à très forte ouverture numérique permet de créer un fort gradient d'intensité lumineuse dirigé vers le point de focalisation dans les trois directions de l'espace. En effet, plus l'ouverture numérique d'un objectif est grande, plus les rayons convergent rapidement vers le point focal. On peut ainsi piéger un objet diélectrique (figure 2.2B). La pression de radiation n'étant pas tout à fait négligeable, le piège optique se situera un peu après le plan de focalisation. De plus, il faut choisir un objet d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu.

# 2.3 Montage expérimental

#### 2.3.1 Montage de la pince optique

Le schéma du montage optique est représenté figure 2.3. Un laser à fibre d'Ytterbium (IPG photonics, YLM-10-1050, 10W, TEM<sub>00</sub>) permet d'envoyer un faisceau gaussien de longueur d'onde égale à 1050 nm. Le choix de cette longueur d'onde est important car l'absorption du champ électromagnétique peut chauffer le milieu. Le vivant étant composé en majorité d'eau, il est nécessaire de choisir un laser émettant dans le proche infra-rouge car le spectre d'absorption des molécules d'eau présente un minimum vers 1060 - 1100 nm [49, 100]. Il y a tout de même une faible absorption, l'échantillon biologique est donc maintenu à une température de 35°C au lieu de 37°C afin de limiter les dégradations causées par l'échauffement.

Afin d'avoir le point focal du laser dans le plan de visualisation du microscope et une bonne couverture de l'objectif par le faisceau, une combinaison de lentilles divergentes puis convergentes élargissent le faisceau et le rendent parallèle. Ensuite, une succession de miroirs réfléchissent le faisceau jusqu'à l'objectif. Le dernier miroir est un *miroir dichroïque* qui permet de réfléchir la lumière infra-rouge et de laisser passer le visible afin d'observer l'échantillon.

Le montage d'une pince optique nécessite l'utilisation d'un microscope inversé (Olympus IX71) où l'échantillon est éclairé par le dessus. Le microscope est muni d'un objectif à huile de grossissement x100 et d'une ouverture numérique de 1.30 (Olympus UPlanFL 100x oil). L'huile de l'objectif qui a un indice de réfraction proche de celui du verre<sup>3</sup> permet d'éviter la dégradation du faisceau due à la réfraction au passage d'un milieu à un autre.

#### 2.3.2 Cale piézoélectrique

Pour exercer des forces sur une bille diélectrique, il est nécessaire de contrôler sa distance avec le centre du piège optique. Notre montage étant muni d'un piège optique fixe, l'échantillon est monté sur une cale piézoélectrique (Physik Instrumente PZ D-050) qui permet des déplacements nanométriques dans les trois directions de l'espace (x,y,z). La

<sup>3.</sup> L'objectif et la lamelle de l'échantillon sont composés de verre.



**FIGURE 2.2** – En A : sphère diélectrique dans un champ non-uniforme. La force de Coulomb exercée sur chaque côté de la bille est différente ( $F_1 < F_2$ ), la bille subit donc une force non-nulle appelée force de gradient et dirigée vers les zones où le champ est le plus fort. Si la sphère diélectrique est plongée dans un milieu diélectrique soumis à un champ non-uniforme, des charges  $Q_m$  s'accumulent sur les bords du diélectrique, il est donc indispensable d'avoir un indice de réfraction de la bille diélectrique supérieur à celui du milieu pour avoir une force orientée vers les champs forts. Les couleurs foncées représentent les champs forts. En B : schéma d'une bille diélectrique dans un piège optique. La forte focalisation d'un faisceau gaussien permet d'avoir un fort gradient d'intensité du champ électromagnétique. Les faisceaux lumineux (en rouge bordeaux) sont de plus forte intensité au centre du piège et attirent la bille diélectrique vers la position d'équilibre située au centre. En C : principe de la calibration du piège.



**FIGURE 2.3** – Schéma du montage optique. Le faisceau laser est dévié par des miroirs et arrive dans l'objectif à immersion qui le focalise sur l'échantillon. Celui-ci est maintenu par une cale piézoélectrique permettant de le déplacer dans les trois directions de l'espace. Afin d'avoir une continuité d'indice lumineux, une goutte d'huile est placée entre l'objectif et la lamelle de verre. L'échantillon est composé d'une lame et d'une lamelle de verre maintenues par un espaceur adhésif. Des billes de silice recouvertes de RGD vont s'accrocher aux cellules adhérentes sur de la fibronectine.

tension aux bornes du piézo électrique est commandée par un programme *Labview*. Celuici commande des déplacements de différents types tels que des oscillations utiles pour la calibration du piège optique ou des créneaux permettant de sonder la réponse viscoélastique lors de la mesure de microrhéologie active. La figure 2.4 représente la réponse de la cale piézoélectrique à un échelon de tension de 100 mV, le temps de montée est de 4 ms.



**FIGURE 2.4** – Réponse de la cale piézoélectrique à un échelon de tension de 100 mV. Le piézo se déplace alors de 0.6  $\mu$ m avec un temps de montée de 4 ms.

#### 2.3.3 Calibration du piège optique

Le piège optique se comporte au voisinage de la position d'équilibre comme un potentiel harmonique. En d'autres termes, à l'instar d'un ressort idéal, la force  $\vec{F}$  exercée par le laser sur la bille diélectrique est proportionnelle à la distance  $\Delta r$  entre le centre du piège optique et la bille (figure 2.2C),

$$\vec{F} = k\Delta r \vec{u}_r,\tag{2.6}$$

où k est la raideur du piège et où le vecteur  $\vec{u}_r$  est dirigé vers le centre du piège optique.

Il est impossible de calculer théoriquement cette grandeur car elle dépend de beaucoup de paramètres tels que la puissance et la longueur d'onde du laser, la taille de la bille, les indices de réfraction du milieu et de la bille... Nous mesurons expérimentalement la raideur k du piège optique. Il existe deux méthodes pour calibrer un piège optique : la méthode de la mesure du spectre de fluctuation utilisant le théorème de fluctuation-dissipation et la

méthode de mesure de la raideur par flux hydrodynamique. La première a l'inconvénient de mesurer la raideur pour de petits déplacements autour de la position d'équilibre, c'est pourquoi nous avons utilisé la méthode hydrodynamique.

#### Mesure de la raideur du piège par flux hydrodynamique

La mesure de la raideur du piège optique est effectuée en appliquant une force visqueuse sur la bille piégée (figure 2.2C). Pour cela, un échantillon de billes en immersion dans l'eau est préparé. En appliquant un flux hydrodynamique laminaire<sup>4</sup>, l'eau va générer une force sur la bille appelée force de Stokes,

$$F_{\text{Stokes}} = 6\pi a \eta_{eau} v, \qquad (2.7)$$

où  $\eta$  est la viscosité de l'eau en Pa/s, v la vitesse d'écoulement par rapport à la bille et a le rayon de la bille. La bille n'étant pas dans un milieu infini, une correction de la force de Stokes est nécessaire pour prendre en compte la proximité de la bille avec la lamelle de verre. On ajoute un facteur  $\beta(a/h)^5$  qui dépend du rayon a de la bille et de sa distance h à la lamelle de verre [100]. La force de Stokes corrigée s'écrit :

$$F_{\text{Stokes}}^{c} = 6\pi a\beta (a/h)\eta_{\text{eau}}v.$$
(2.8)

En pratique, on applique un flux sur une bille piégée en déplaçant sinusoïdalement l'échantillon à l'aide de la cale piézoélectrique. Le déplacement du piézoélectrique s'écrit :

$$x_{\rm piézo}(t) = x_0 \sin(2\pi f t)$$

La position de la bille par rapport au centre du piège est alors forcée périodiquement<sup>6</sup> :

$$x_{\text{bille}}(t) = x \sin(2\pi f t + \phi).$$

La force de Stokes  $F_{\text{Stokes}}^{c}$ <sup>7</sup> s'égalise avec la force rappel F(x) du piège. En utilisant la notation complexe, et en prenant le module de x on a :

$$F(x) = kx = 12\pi^2 f a \eta_{\text{eau}} \beta(a/h) \sqrt{x_0^2 - x^2}.$$
 (2.9)

Pour avoir la raideur du piège, il suffit de faire varier l'un des deux paramètres : la fréquence f ou l'amplitude  $x_0$  d'oscillation de l'échantillon. De plus, la raideur du piège est proportionnelle à la puissance P du laser :  $F(x) = kx = P\alpha_1 x$  où  $\alpha_1$  s'exprime en pN/Wµm. Toutes les mesures de calibration ont été faites à une hauteur  $h = 10 \ \mu m$  de la lamelle.

5. L'expression de  $\beta$  s'écrit [100] :  $\beta(X) = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}X + \frac{1}{8}X^3 - \frac{45}{256}X^4 - \frac{1}{16}X^5}$  où  $X = \frac{a}{h}$ . 6. L'équilibre des forces est atteint instantanément, l'inertie est négligeable. On peut estimer la durée du

régime transitoire :  $\tau \sim \frac{\rho_{eau}d^2}{\eta_{eau}} \sim 10^{-6}$  s qui est petit devant la fréquence d'acquisition des images. 7. Pour le calcul de cette force, la vitesse du fluide par rapport à celui de la bille dans le référentiel du

<sup>4.</sup> Le nombre de reynolds Re correspondant à cet écoulement peut être estimé : Re  $\sim \frac{\rho_{eau} dv}{\eta_{eau}} \sim 10^{-6} \ll 1$ en prenant le diamètre  $d = 1 \mu m$ , la vitesse  $v = 1 \mu m/s$ .

laboratoire est  $v = v_{piézo} - v_{bille}$ .

#### Courbe de calibration

Au cours de ces trois années, deux objectifs de microscope ont été utilisés, ils seront notés objectif 1 et objectif 2. La figure 2.5 gauche représente la fonction F/P en fonction de la distance au centre du piège x. La courbe noire correspondant à l'objectif 1 s'ajuste très bien avec une fonction linéaire de pente  $\alpha_1 = 240.7 \pm 1.3 \text{ pN/W}\mu\text{m}$ . Seulement, avec l'objectif 2, on voit que le piège présente des non-linéarités pour de grands déplacements, l'ajustement se fait avec un polynome du second degré. On voit une légère différence entre les deux directions du piège (courbe rouge et courbe bleue) qui traduit une dissymétrie du faisceau dans le plan focal. Le résultat des ajustements polynomiaux tel que  $F/P = \alpha_1 x + \alpha_2 x^2$  où  $\alpha_1$  s'exprime en pN/Wµm et  $\alpha_2$  en pN/Wµm<sup>2</sup> est :

- dans la direction X (courbe bleue) :  $\alpha = 256.1 \pm 3.0 \text{ pN/W} \mu \text{m}$  et  $\beta = 301.8 \pm 10.6 \text{ pN/W} \mu \text{m}^2$ ;
- dans la direction Y (courbe rouge) :  $\alpha = 239.4 \pm 4.8$  pN/Wµm et  $\beta = 279.8 \pm 16.1$  pN/Wµm<sup>2</sup>.

Enfin, avec l'ancien objectif, des calibrations ont été effectuées avec des billes de différentes tailles (figure 2.5 droite). De façon intéressante, on voit que la raideur du piège est inversement proportionnelle au diamètre *d* de la bille :  $\frac{F}{P} = \sigma \frac{x}{d}$  où  $\sigma = 378 \pm 2 \text{ pN/W}$ .



**FIGURE 2.5** – À gauche, courbe de calibration de la raideur de la pince optique :  $\frac{F}{P}(x)$  où F est la force en pN, P la puissance du laser en W et x la distance de la bille au centre du piège en  $\mu$ m. Cette courbe est linéaire pour la calibration de l'objectif 1 utilisé mais pour celle de l'objectif 2 des non-linéarités apparaissent et un ajustement avec un polynôme de degré deux est nécessaire. À droite,  $\frac{F}{P}(x)$  est tracé pour différents diamètres de billes (et pour l'objectif 2). On voit que la raideur du piège optique est inversement proportionnelle à la taille de la bille telle que :  $\frac{F}{P} = \sigma \frac{x}{d}$  où  $\sigma$  s'exprime en pN/W.

#### La force d'échappement

Pour vérifier la raideur du piège avant chaque expérience, une mesure de la force nécéssaire pour faire sortir la bille du piège est effectuée. Comme pour une mesure de calibration, on applique un flux hydrodynamique et on augmente pas à pas la force de Stokes jusqu'au moment où la bille sort du piège.

#### 2.3.4 Échantillon expérimental

Un schéma de l'échantillon est présenté en haut à droite de la figure 2.3. L'essentiel des connaissances de cette partie proviennent de Alain Richert, technicien en biologie au laboratoire Matière et systèmes complexes et de la thèse de Delphine Icard-Arcizet [49].

#### Entretien et préparation des cellules

Nous avons décidé de travailler sur des cellules C2C12. Ces myoblastes sont des cellules musculaires non-différenciées. Elles sont cultivées en incubateur à 37°C dans une flasque contenant du milieu de culture DMEM complet<sup>8</sup>. Quand les cellules C2C12 entrent en confluence, elles commencent à se différencier en myotubes. Il est donc très important de les détacher de leur support avec de la trypsine<sup>9</sup> avant une confluence de 50%, et de les ensemencer dans une nouvelle boîte de culture<sup>10</sup>.

Vingt-quatre heures avant l'expérience, les cellules sont déposées sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine. La fibronectine est un composant de la matrice extracellulaire. Elle possède des sites RGD sur lesquels les protéines d'adhésion des cellules, les intégrines, peuvent se lier spécifiquement. Le protocole d'adsorption de la fibronectine sur des lamelles de verre est présenté en annexe B.1.2.

#### Adhésion des billes aux récepteurs de l'adhésion cellulaire

Un des éléments essentiels de notre expérience est la sonde diélectrique qui nous permet à la fois d'effectuer des mesures passive et active. La sonde utilisée est composée de silice, elle a un indice de réfraction  $n_{silice} = 1.51$  supérieur à celui d'un milieu composé essentiellement d'eau  $n_{eau} = 1.33$ .

<sup>8.</sup> On ajoute dans le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de la glutamine à 2mM, du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% et des antibiotiques (pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 50 mg/mL). Le SVF contient une grande variété de protéines telles que la BSA (albumine de sérum bovin). Il contient aussi des facteurs de croissance et des molécules lipidiques. Il est très important de toujours utiliser le même dosage de sérum car un changement aurait un impact sur le métabolisme de la cellule. Par exemple, le phospholipide lpa est une molécule impliquée dans la contractilité cellulaire [54] et peut donc avoir une influence sur nos mesures de microrhéologie.

<sup>9.</sup> On utilise un mélange de PBS (solution tampon), d'EDTA à 0,02% et de trypsine à 0,05% (Invitrogen). La trypsine est une enzyme qui a la capacité de rompre les protéines d'adhésion. L'EDTA réduit la concentration extracellulaire en calcium ce qui neutralise les cadhérines.

<sup>10.</sup> Le SVF du milieu de culture va alors interrompre l'action de la trypsine.

Pour étudier l'activité du réseau d'actine sous-membranaire, on attache une bille aux récepteurs transmembranaire de l'adhésion cellulaire qui sont reliés aux filaments d'actine corticale par l'intermédiaire de plusieurs protéines (figure 2.1 droite). Pour cela, la bille est recouverte du complexe PepTide 2000 (Telios Pharmaceuticals, CA, USA). Ce complexe est en partie composé de peptides RGD (Arg-Gly-Asp) qui est le composant de la fibronectine s'attachant spécifiquement aux intégrines. On utilise des billes de silice de 1.56  $\mu$ m de diamètre accompagnées de groupements carboxyles -COOH. Le complexe PepTide 2000 utilisé contient à son extrémité la molécule NH<sub>2</sub> qui va former une liaison amide avec le groupement carboxyle. De plus, ce complexe contient un espaceur constitué d'une séquence de 23 acides aminés A<sub>23</sub> éloignant physiquement le peptide RGD de la liaison amide, ce qui rend la séquence RGD plus disponible pour les intégrines. La réaction chimique entre le complexe contenant du RGD et la bille de silice carboxylée est du type :

$$SiO_2 - COOH + NH_2 - A_{23} - RGD \longrightarrow SiO_2 - CO - NH - A_{23} - RGD + H_2O$$

En annexe B.1.1 est présenté le protocole de cette réaction chimique. Il est possible de contrôler la densité des peptides RGD recouvrant la bille. Nous verrons par la suite que celle-ci a une grande influence sur les mesures de microrhéologie passive et active. La concentration de RGD n'est pas exactement connue, mais nous pouvons faire varier la quantité de RGD disponible lors de la réaction chimique ci-dessus. Nous estimons donc une concentration relative à la concentration de référence qui théoriquement va recouvrir tous les sites carboxyles -COOH. Nous noterons par exemple RGD de concentration 1/10 par rapport à la concentration de référence.

#### Préparation de l'échantillon expérimental

Trente minutes avant l'expérience, les billes recouvertes de RGD sont mises en contact avec les cellules C2C12 (annexe B.1.3). Cinq minutes avant l'expérience, la lamelle recouverte de fibronectine, sur laquelle sont étalées les cellules, est rincée avec du DMEM complet afin de retirer les billes en suspension qui n'ont pas adhéré. Ensuite cette lamelle est collée sur une lame de microscope avec un espaceur adhésif souple (Gene Frame® 65  $\mu$ L 1.5x1.6 cm). Celui-ci confère à la chambre expérimentale un volume de 65  $\mu$ L qui est rempli avec du milieu de culture DMEM complet. Cet échantillon expérimental est alors attaché à la cale piézoélectrique dans une enceinte thermostatée à 35°C.

# 2.4 Acquisition d'images et détection de particules

#### 2.4.1 Caméra rapide

Afin d'enregister les déplacements de la sonde, une caméra rapide (FASTCAM-ultima 1024) est utilisée en sortie du microscope (figure 2.3). Cette caméra a l'avantage de n'avoir aucun système de ventilation susceptible de générer des vibrations, en effet, les disques durs sont séparés physiquement de la caméra. L'inconvénient est que nous ne disposons

que d'une caméra très ancienne. Elle a un disque dur de petite capacité et surtout le temps de transfert des images est très long ( $\sim 40$  images/s). Pour mesurer le spectre des forces, il est préférable de faire à la suite les mesures de microrhéologie passive puis active, et donc de les enregistrer sur un même film. La capacité du disque a contraint la fréquence d'acquisition des films à 125 et 250 images/s pour des images de 128 x 128 pixels<sup>11</sup>. Ainsi les faibles capacités de cette caméra ont ralenti les expériences, il a été plus long d'avoir une statistique correcte sur les mesures. En moyenne, il était possible d'obtenir cinq mesures par jour.

Afin de diminuer au minimum le bruit de la détection, la sensibilité de la caméra est réduite au minimum. De plus, les films sont enregistrés dans un format d'image noncompressé afin de garder toutes les informations dans chaque pixel pour la détection de particule.

#### 2.4.2 Détection de particules

Afin de détecter les différentes positions de la bille nous utilisons un algorithme de détection de particules utilisant la corrélation d'images. Celui-ci est un programme en java fonctionnant avec *imageJ* et developpé par Olivier Cardoso (http://sites.google.com/site/oliviercardoso/Home/plugins).

Les images enregistrées par la caméra rapide sont en fait une matrice carrée de taille 128 x 128 correspondant au nombre de pixels de valeur comprise entre 0 (noir) et 255 (blanc). L'objet sphérique a un profil d'intensité particulier qui ne change pas (ou peu) durant tout l'enregistrement. La méthode de détection d'objet compare une image *I* de taille N x N pixels (figure 2.6B) à une autre image de référence  $I_0$  de même taille (figure 2.6A). Pendant un pas de temps  $\delta t$  assez court, l'objet va se déplacer d'une courte distance comprise dans une fenêtre de recherche qui peut se déplacer sur M x M pixels. On calcule alors la fonction de corrélation C(X,Y) entre l'image de référence et chaque image de taille N x N de la fenêtre de recherche (figure 2.6C),

$$C(X,Y) = \sum_{i=0}^{N} \sum_{j=0}^{N} I(i+X,j+Y) I_0(i,j), \qquad (2.10)$$

où *X* et *Y* sont les différents pixels de la fenêtre de recherche. Cette fonction de corrélation sera maximale quand  $I = I_0$  et l'objet sera localisé aux positions  $X_{max}$  et  $Y_{max}$  (figure 2.6D). Afin de calculer la position correspondant au maximum de la fonction de corrélation, celleci est interpolée par une paraboloïde :

$$C(X,Y) = a + bX + cY + dX^{2} + eY^{2}.$$
(2.11)

Cette interpolation permet d'accéder à une résolution en dessous du pixel. Avec notre microscope, 1 pixel = 75 nm, la résolution est inférieure à 75 nm. La bille de 1.56  $\mu$ m de diamètre occupe 20 pixels, donc en pratique on choisi une taille d'image N = 20 pixels.

<sup>11.</sup> Il est possible d'enregistrer seulement 65536 images de 128 x 128 pixels en une fois avec cette caméra.

Plus la fonction de corrélation est calculé sur un gand nombre de pixels, plus le niveau de détection augmente. La plus petit déplacement  $\delta x$  détectable par cet algorithme varie en  $\delta x \sim N^{-1}$ , ce qui nous donne une détection théorique de 4 nm.



FIGURE 2.6 – Principe de la détection d'image par corrélation.

#### 2.4.3 Limitations expérimentales

Les salles d'expérimentations contiennent des appareils de mesures susceptibles de générer des vibrations mécaniques. En effet, des éléments électriques comme les alimentations ont un système de refroidissement composé de ventilateurs. Afin d'éviter toute interférence entre l'échantillon et ces vibrations, le microscope, le laser et la chambre expérimentale sont placés sur une table optique isolée par des pneumatiques. Le nombre d'appareils sur cette table est réduit à son strict minimum, et les fils électriques les reliant à leurs alimentations sont attachés au sol et à la table pour ne pas propager les vibrations. Seulement, le système de thermalisation ne peut pas être retiré de la table optique, la soufflerie est donc éteinte pendant chaque mesure.

Dans des conditions normales, la mesure du mouvement d'une bille x(t) attachée au cytosquelette d'une cellule est la somme de trois contributions : le bruit inhérent au dispo-

sitif expérimental  $x_{bruit}(t)$ , la dérive éventuelle de la platine du microscope  $x_{dérive}(t) = vt$ où v est la vitesse de dérive et les déplacement  $x_s(t)$  dus aux forces stochastiques exercées par la cellule. Cette dernière contribution est la seule qui nous intéresse pour la suite, il est donc nécessaire de caractériser le bruit et la dérive du système.

Pour mesurer le bruit du système expérimental, une bille de silice est collée sur une lamelle de microscope et son déplacement est enregistré dans les conditions usuelles de l'expérience. Sur la figure 2.7 droite, le déplacement quadratique moyen  $\Delta x_{fixe}^2(\tau)$  d'une bille immobille est tracé à différents moments de la thèse et pour différentes fréquences d'acquisition (125, 250 et 1000 images/s). La position d'une bille fixe est  $x_{fixe} = x_{bruit}(t) + x_{dérive}(t)$ , le déplacement quadratique moyen s'écrit :

$$\Delta x_{\text{fixe}}^2(\tau) = \Delta x_{\text{bruit}}^2(\tau) + \Delta x_{\text{dérive}}^2(\tau)$$
$$= \Delta x_{\text{bruit}}^2(\tau) + v^2 \tau^2.$$

De plus, si le bruit a une composante périodique de la forme  $x_{bruit}(t) = x_{détection} + x_{mécanique}$ due à des vibrations mécaniques et à la détection de la caméra. On peut écrire :  $x_{bruit}(t) = x_d + x_m \cos(\omega t)$  soit :

$$\Delta x_{\text{fixe}}^2(\tau) = x_d^2 + x_m^2 (1 - 2\cos(\omega\tau)) + v^2 \tau^2.$$
(2.12)

Pour des petits temps ( $\tau < 1$  s),  $\Delta x_{fixe}^2(\tau)$  présente un plateau avec une amplitude maximum de 4nm<sup>2</sup>. Le déplacement quadratique moyen atteint ensuite pour  $\tau > 1$  s un régime balistique  $\Delta x_{fixe}^2(\tau) = v^2 t^2$  où v est la vitesse de dérive de la platine. Celle-ci ne semble pas constante et a une valeur de l'ordre de 50 nm/min. Pour s'affranchir de cette dérive, une bille de référence est utilisée pendant chaque expérience (figure 2.8). Nous avons remarqué que des billes recouvertes de RGD en forte concentration s'attachent très facilement à la lamelle de microscope recouverte elle-même de fibronectine. Au dernier moment avant chaque mesure, une petite quantité de billes, de diamètre égal à 3.47 µm, recouverte d'une forte concentration de RGD est insérée dans la chambre expérimentale. Ces billes de référence ont un diamètre différent (3.47 µm) de celles attachées au cytosquelette (1.56 µm) pour mieux les différencier.

Une fois la cellule myoblaste trouvée, une bille de référence est attrapée avec la pince optique et collée à la fibronectine à l'endroit voulu en la plaquant sur la lamelle durant une vingtaine de seconde. Cette bille est assez attachée à la lamelle pour suivre la dérive de la platine, mais elle présente un mouvement brownien aux temps courts dû à l'action des forces thermiques du milieu de culture environnant. Toutefois, la partie intéressante étant le mouvement de la bille de référence aux temps longs, une moyenne glissante sur trente secondes est calculée sur la trajectoire de la bille de référence. Celle-ci nous donne la dérive globale  $x_{dérive}(t) = \langle x_{ref}(t) \rangle_{30s}$  de la platine que nous soustrayons au mouvement des billes x(t) attachées au cytosquelette afin d'obtenir la trajectoire réelle de la bille  $x_s(t)$ :

$$x_s(t) + x_{\text{bruit}} = x(t) - x_{\text{dérive}}(t).$$
(2.13)

Sur la figure 2.7 droite, l'insert montre la trajectoire d'une bille fixe  $x_{\text{fixe}}$  (courbe noire) et celle d'une bille fixe sans la dérive  $x_{\text{fixe}} - \langle x_{\text{fixe}}(t) \rangle_{30\text{s}}$  (courbe rouge). On voit alors que le

déplacement quadratique moyen de la courbe rouge ne présente plus de régime balistique au temps long.

Enfin, nous avons constaté qu'il y avait un bruit à 50 Hz dû au bourdonnement des alimentations électriques. Sur la transformée de Fourier des trajectoires, un pic à 100 Hz, 50 Hz et à 25 Hz peut apparaître. Un filtre <sup>12</sup> est donc appliqué à ces fréquences sur les enregistrements.

# 2.5 Calcul des transformées de Laplace

La définition de la transformée de Laplace d'un signal temporel continu f(t) est :

$$\mathscr{L}\lbrace f(t)\rbrace = \int_{0}^{+\infty} f(t)e^{-st}dt.$$
(2.14)

En pratique, la fonction f(t) est discrète :  $\{f_i\}_{i \in [1,N]}$ . Le signal temporel s'écrit

$$f(t) = f_i(i\Delta t), \qquad (2.15)$$

où  $\Delta t$  est l'inverse de la fréquence d'acquisition des images ( $\Delta t = 0.008$  s pour une fréquence de 125 images/s). La transformée de Laplace est donc une somme sur les indices *i* pour des fréquences  $s \in \left[\frac{1}{N\Delta t}, \frac{1}{\Delta t}\right]$ :

$$\hat{f}(s) = \mathscr{L}\{f_i\} = \sum_{i=0}^{N} f_i e^{-si\Delta t} \Delta t.$$
(2.16)

La transformée de Laplace est définie sur  $t \in [0, +\infty]$ , il est nécessaire d'extrapoler la fonction f(t) dans l'intervalle  $[t_{\max}, +\infty]$  par une constante égale à  $f(t_{\max}) = f_i(N\Delta t)$ . Cela nous amène à ajouter un terme constant dans le calcul de la transformée de Laplace discrète :

$$\hat{f}(s) = \mathscr{L}\{f_i\} = \sum_{i=0}^{N} f_i e^{-si\Delta t} \Delta t + \frac{f_i(N\Delta t)e^{-sN\Delta t}}{s}.$$
(2.17)

De plus, d'après le théorème d'échantillonage de Nyquist-Shannon, la fréquence d'échantillonage de la transformée de Laplace doit être supérieure au double de la fréquence d'acquisition du signal. Il en résulte que la transformée de Laplace est valable pour des fréquences  $s \in \left[\frac{1}{N\Delta t}, \frac{1}{2\Delta t}\right]$ .

## 2.6 Calcul des moyennes et des erreurs statistiques

L'estimation de la moyenne d'un ensemble de points dépend de la distribution statistique de ces points. Si la distribution est normale alors on calcule la moyenne usuelle. Pour

<sup>12.</sup> Pour des acquisitions à 125 images/s un filtre à 50 Hz et 25 Hz est appliqué, pour les acquisitions à 250 images/s le filtre supprime les trois fréquences : 100 Hz, 50 Hz et à 25 Hz.



**FIGURE 2.7** – À gauche, le déplacement quadratique moyen de différentes billes collées sur une lamelle de microscope. À droite, dans l'insert, la trajectoire d'une bille fixe est représenté en noir et, en rouge, la même trajectoire à laquelle la dérive est soustraite. Le déplacement quadratique moyen correspondant ne présente plus de comportement balistique aux temps longs.



**FIGURE 2.8** – Photo d'une cellule C2C12 en position d'étalement sur de la fibronectine. L'expérience est effectuée sur les billes accrochées à la cellule. Une bille de plus grande taille recouverte de RGD en forte concentration est placée à proximité de la cellule afin de rentrer dans le champ de la caméra. Celle-ci va permettre de mesurer la dérive de la platine du microscope.

*n* mesures d'une grandeur *x*, la moyenne et l'erreur standard s'écrivent :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$$
 et  $SE_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)}} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2.$  (2.18)

Certaines grandeurs biologiques ont plutôt une distribution log-normale [26], dans ce cas, les moyennes sont dites géométriques ce qui revient à faire une moyenne sur le logarithme de cette grandeur qui est normalement distribuée. Pour n mesures d'une grandeur x, la moyenne géométrique et l'erreur standard correspondante s'écrivent :

$$\overline{\ln(x)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} \ln(x_i) \text{ et } SE_{\overline{\ln(x)}} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)}} \sum_{i=1}^{n} (\ln(x_i) - \overline{\ln(x)})^2.$$
(2.19)

On écrit alors :

$$\bar{x} \pm SE_{\bar{x}} = e^{\overline{\ln(x)}} e^{SE_{\overline{\ln(x)}}}.$$
(2.20)

# CHAPITRE **3**

# Résultats expérimentaux et effets de ligand RGD

# Sommaire

3.1	Introduction			
3.2	Résul	Itats expérimentaux sur un exemple témoin	58	
	3.2.1	Microrhéologie passive	58	
	3.2.2	Microrhéhologie active	60	
	3.2.3	Spectre des forces exercées sur la sonde	61	
	3.2.4	Écart du système à l'équilibre thermodynamique	64	
3.3	Effets	de la variation de la concentration de ligand entre la		
	sonde	e et le cortex	66	
	3.3.1	Nombre de liens bille-cellule	66	
	3.3.2	Fluctuations passives	67	
	3.3.3	Statistiques sur le déplacement quadratique moyen	68	
	3.3.4	Mesure de la fonction de réponse viscoélastique	77	
	3.3.5	Calcul de la fonction de corrélation des forces	79	
	3.3.6	De l'équilibre thermodynamiques aux forces d'origines biolo-		
		giques	84	
3.4	Conc	lusion	87	

## 3.1 Introduction

Dans un premier temps, nous allons présenter les comportements récurrents à l'aide d'un exemple typique. Tous les résultats de microrhéologie passive et active ont des tendances similaires quel que soit le type d'expérience. Cette première partie va permettre de rappeler quelques notions explicitées dans le chapitre 1 et de les visualiser à l'aide d'un exemple témoin. Nous allons ensuite caractériser l'influence d'un paramètre important : le nombre de liens entre la bille et la cellule. Nous étudierons son impact sur des grandeurs telles que le spectre des forces exercées sur la bille ou encore l'écart du système bille-cellule à l'équilibre thermodynamique.

#### 3.2 Résultats expérimentaux sur un exemple témoin

#### 3.2.1 Microrhéologie passive

La mesure de microrhéologie passive (section 1.2.2) est l'enregistrement du mouvement d'une sonde en contact avec le milieu. Les différentes positions en fonction du temps  $\{x(t), y(t)\}$  sont ensuite extraites du film par l'algorithme de suivi de particules. Un exemple de mouvement spontané d'une bille attachée à l'actine corticale est donné en figure 3.1. Pour extraire des informations de cette trajectoire, il est nécessaire de calculer le déplacement quadratique moyen de la bille<sup>1</sup>. En pratique, nous avons accès à la suite des positions de la sonde  $\{x_i, y_i\}_{i \in [1,N]}$  où N est le nombre total de positions. Si  $\Delta t$ est le temps entre l'enregistrement de deux images, la grandeur  $N\Delta t$  est la durée totale de l'enregistrement<sup>2</sup>. Le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  où  $\tau = n\Delta t$  s'écrit alors

$$\Delta x^{2}(\tau) = \langle (x(t+\tau) - x(t))^{2} \rangle_{t} = \Delta x^{2}(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_{i})^{2}.$$
 (3.1)

#### Microrhéologie passive sur l'exemple témoin

La figure 3.2 gauche représente le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  d'une trajectoire de bille. Sur la figure 3.1, la position de la bille semble être à la fois fluctante et confinée aux temps courts et la trajectoire apparaît dirigée aux temps longs. Cela se traduit par deux comportements en loi de puissance (voir section 1.3.4).

Pour  $\tau \leq 1$  s, on a  $\Delta x^2(\tau) \sim A_1 (\tau/\tau_0)^{\alpha_1}$  avec  $\alpha_1 < 1$ , le mouvement de la bille est dit sous-diffusif. Ce type de régime aux temps courts a été observé auparavant sur des systèmes similaires [81, 13, 14, 66, 42]. Le mouvement de la bille à ces échelles de temps est partiellement confiné par le réseau d'actine, certains auteurs parlent de mouvement « dans une cage » ou « caged » [57]. Sur l'exemple de la figure 3.2 gauche, en prenant  $\tau_0 = 1$  s, on a  $A_1 \approx 21$  nm<sup>2</sup> et  $\alpha_1 \approx 0.16$ .

<sup>1.</sup> Le spectre des vitesses est relié au déplacement quadratique moyen (voir la section A.2). De plus, si le milieu est à l'équilibre, le déplacement quadratique moyen est directement relié à la fonction de réponse linéaire du système (voir équation 1.22).

<sup>2.</sup> L'enregistrement des fluctuations est de 8 min 30 s à 125 images/s et 4 min 15 s à 250 images/s.



**FIGURE 3.1** – Exemple d'une trajectoire de bille attachée à l'actine corticale *via* les intégrines pour un enregistrement de 8 min 30 s.

Pour  $\tau \gtrsim 1$  s, on a  $\Delta x^2(\tau) \sim A_2(\tau/\tau_0)^{\alpha_2}$  avec  $\alpha_2 > 1$ , le comportement est dit surdiffusif. À cette échelle de temps, le mouvement de la bille est dirigé. Il est peut-être entraîné par des forces exercées par le cytosquelette. Sur l'exemple de la figure 3.2 gauche, en prenant  $\tau_0 = 1$  s, on a  $A_2 \approx 10$  nm<sup>2</sup> et  $\alpha_2 \approx 1.5$ .

La courbe 3.2 droite est la transformée de Laplace de la courbe de gauche. Elle présente aussi deux régimes en loi de puissance. En effet, une loi de puissance dans l'espace temporel implique une loi de puissance dans l'espace fréquentiel :

$$\Delta x^{2}(\tau) = A\left(\frac{\tau}{\tau_{0}}\right)^{\alpha} \Longleftrightarrow \Delta \hat{x}^{2}(s) = A\phi(1+\alpha)\left(\frac{s}{s_{0}}\right)^{-\alpha-1},$$
(3.2)

où  $\phi(1+\alpha) = \int_0^\infty e^{-x} x^\alpha dx$  est la fonction d'Euler [7].



**FIGURE 3.2** – Traitement des données issues de l'expérience de microrhéologie passive. À gauche, la figure représente un exemple de déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$ . Aux temps courts, le déplacement quadratique moyen se caractérise par un comportement sous-diffusif. Aux temps longs, il a un comportement sur-diffusif. À droite, la transformée de Laplace de la courbe de gauche  $\Delta \hat{x}^2(s)$  est tracée en fonction de la fréquence *s*. En prenant  $\tau_0 = 1$  s, on a  $A_1 \approx 21$  nm<sup>2</sup>,  $\alpha_1 \approx 0.16$ ,  $A_2 \approx 10$  nm<sup>2</sup> et  $\alpha_2 \approx 1.5$ .

#### 3.2.2 Microrhéhologie active

La mesure de microrhéologie active permet de sonder la viscoélasticité du milieu en contact avec la bille (voir section 1.2.2). Une force est exercée sur celle-ci à l'aide de la pince optique. La figure 3.3 présente le principe de la mesure de microrhéologie active qui se déroule comme suit.

À t = 0, la bille est au centre du piège optique. À  $t = 0^+$ , le piézo effectue un créneau de déplacement <sup>3</sup> (figure 2.4). La bille se retrouve alors à une distance  $x_{step}$  du centre du piège qui exerce donc une force  $F_{step} = kx_{step}$  où k est la raideur de la pince optique. Le déplacement en créneau de la cale piézoélectrique est  $x_{step} = 0.6 \ \mu m^4$  ce qui fait une force  $F_{step} \sim 150 \ pN$  pour une puissance de laser de 1 W. Sous l'action de la force du piège, le milieu attaché à la bille se déforme, la bille se rapproche alors du centre du piège en se déplaçant d'une distance x(t). La figure 3.4 est un exemple d'enregistrement de la trajectoire d'une bille attachée au cortex d'actine et soumise à une force. Le milieu se déforme sous l'effet de la force exercée sur la bille qui se rapproche du centre du piège optique. Dans le même temps, la force exercée sur la bille diminue. La mesure active ne s'effectue pas à force constante et la géométrie de contact nous est inconnue, par conséquent ce n'est pas une expérience de fluage dans sa forme canonique (voir section 1.2.2). Toutefois d'après

<sup>3.</sup> En réalité, le piézo fait sa transition entre t = 0 et  $t = \Delta t$ , ce qui est la définition du t = 0.

<sup>4.</sup> La bille utilisée à un diamètre de  $d_{\text{bille}} = 1.56 \,\mu\text{m}$ , pour rester dans un régime de petite déformation, le créneau imposé doit être une fraction de la taille de la sonde. Nous avons choisi  $x_{\text{step}} \sim d_{\text{bille}}/3$ .

l'équation 1.14, nous pouvons écrire la relation reliant la position de la sonde x(t) reliée à la déformation du milieu cellulaire, la fonction de réponse du milieu J(t) et la force du piège optique  $F(t) = kx_f(t)$  appliquée sur la sonde :

$$x(t) = \int_{0}^{t} J(t - t') \frac{dF}{dt'} \Big|_{t'} dt'.$$
(3.3)

Les grandeurs x(t) et  $x_f(t)$  sont représentées sur les figures 3.3 et 3.4. L'équation 3.3 est une convolution entre la fonction J(t) et la fonction F(t) qu'il est possible de déconvoluer en utilisant les transformées de Laplace (équation 1.15) nous permettant de calculer la grandeur d'intérêt  $\hat{J}(s)$ :

$$\hat{J}(s) = \frac{\hat{x}(s)}{s\hat{F}(s)} = \frac{1}{sk} \frac{\hat{x}(s)}{\hat{x}_{\rm f}(s)}.$$
(3.4)

#### Microrhéologie active sur l'exemple témoin

Juste après la mesure de microrhéologie passive représentée sur la figure 3.2, une mesure de microrhéologie active est effectuée sur la même sonde. Cet ordre des mesures, microrhéologie passive puis active, vient du fait que la première n'est pas une mesure invasive contrairement à la seconde. La figure 3.3 gauche représente à la fois l'évolution de x(t) et F(t) la mesure active. En utilisant l'équation 3.3, la transformée de Laplace de la fonction de réponse du système  $\hat{J}(s)$  est obtenue, elle est représentée sur la figure 3.3 droite. Cette fonction semble avoir un comportement en loi de puissance sur une large gamme de fréquences  $\hat{J}(s) = J_0\phi(1+\beta)s^{-\beta-1}$  ce qui implique qu'elle ait aussi un comportement en loi de puissance dans l'espace temporel  $J(\tau) = J_0\tau^{\beta}$ . Ce comportement a été décrit dans la partie 1.3.3 et a été observé sur un système de pince optique muni d'une rétroaction permettant de faire une expérience de fluage à force constante [50]. Nous obtenons les mêmes types de résultats en déconvoluant nos signaux après l'expérience <sup>5</sup> ce qui est intéressant car cette méthode nous évite d'encombrer le dispositif expérimental par un système de rétroaction.

#### 3.2.3 Spectre des forces exercées sur la sonde

En combinant les mesures de microrhéologie active (figure 3.5 droite) et passive sur une même sonde (figure 3.2 droite), le spectre des forces fluctuantes exercées sur la sonde  $\hat{S}_f(s) = \mathscr{L}\{\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t\}$  est accessible en utilisant la relation (voir section 1.2.2) :

$$\hat{S}_f(s) = \frac{\Delta \hat{x}^2(s)}{2s^2 \hat{f}(s)^2}.$$
(3.5)

<sup>5.</sup> Le système de rétroaction peut être vu comme un système déconvoluant le signal en temps réel.



**FIGURE 3.3** – Schémas décrivant la mesure de microrhéologie active d'une bille attachée au cortex d'actine. Les schémas et les grandeurs indiqués sont reliés à la courbe 3.4. En 1 : à t = 0, la bille est au centre du piège optique. En 2, à  $t = \Delta t$ , le piézo effectue un créneau de déplacement. La bille se retrouve alors à une distance  $x_{step}$  du centre du piège qui exerce donc une force  $F_{step} = kx_{step}$  où k est la raideur de la pince optique. En 3, sous l'action de la force du piège, le milieu attaché à la bille se déforme, la bille se rapproche alors du centre du piège en se déplaçant d'une distance x(t). À l'instant t, la bille se trouve à une distance  $x_f(t)$  du point focal, le piège exerce alors une force  $F(t) = kx_f(t)$ . En 4, à la fin de la relaxation, la bille est revenue au centre du piège optique.



**FIGURE 3.4** – Exemple de mesure de microrhéologie active. La trajectoire brute d'une bille attachée au cortex d'actine et soumise à une force est tracée en fonction du temps. La description de cette mesure est donnée en figure 3.3. En pratique, la mesure active dure 25 s et le déplacement en créneau de la cale piézoélectrique est  $x_{step} = 0.6 \mu m$ .



**FIGURE 3.5** – Résultats de la mesure de microrhéologie active effectuée sur la même sonde que la mesure de microrhéologie passive (figure 3.3). À gauche : en bleu, évolution de la force F(t) en fonction du temps (exprimée en pN), en rouge, évolution de la position x(t) en fonction du temps (exprimé en  $\mu$ m). En déconvoluant ces deux grandeurs avec les transformées de Laplace, on obtient la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$ . À droite : évolution de la transformée de Laplace de la fonction de réponse du système en fonction de la fréquence *s*. Celle-ci semble avoir un comportement en loi de puissance, pour cet exemple l'exposant  $\beta \approx 0.15$ .

Le spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$ , en rouge, est représenté en fonction de la fréquence sur la figure 3.6 gauche. Celui-ci présente deux régimes faisant écho aux deux régimes du déplacement quadratique moyen. Le premier, aux hautes fréquences (temps courts), a un comportement en loi de puissance  $\hat{S}_f(s) \sim s^{2\beta - \alpha_1 - 1}$  et il en va de même pour le deuxième aux basses fréquence  $\hat{S}_f(s) \sim s^{2\beta - \alpha_2 - 1}$  où  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  correspondent respectivement aux puissances du déplacement quadratique moyen aux temps courts et aux temps longs et  $\beta$  la puissance de la fonction de réponse du système.

#### 3.2.4 Écart du système à l'équilibre thermodynamique

Grâce au théorème de fluctuation-dissipation (section 1.2.2), il est possible de calculer la valeur qu'aurait eu le spectre des forces en supposant que le système ait été à l'équilibre avec la même fonction de réponse, c'est-à-dire en supposant que les seules forces agissant sur la bille aient été d'origine thermique. L'expression de  $\hat{S}_{feq}(s)$  est obtenue à partir de la fonction de réponse de la bille  $\hat{J}(s)$  et de la température du système *T* (équation 1.23) :

$$\hat{S}_{feq}(s) = \frac{k_B T}{s^2 \hat{J}(s)}.$$
(3.6)

Le spectre des forces  $\hat{S}_{feq}(s)$  calculé à partir du théorème de fluctuation-dissipation, en bleu pointillé, est tracé en fonction de la fréquence sur la figure 3.6 gauche. À l'instar

de la fonction de réponse, il suit une loi de puissance sur toute la gamme de fréquences. Les deux spectres,  $\hat{S}_f(s)$  et  $\hat{S}_{feq}(s)$ , se confondent à haute fréquence et se séparent autour de 1 Hz. Cela signifie que jusqu'à 1 Hz, le système se comporte comme un système à l'équilibre thermodynamique, les forces mesurées sont d'origine thermique. Passé cette fréquence, les deux courbes s'écartent, signature d'un système s'éloignant de l'équilibre thermodynamique. Autrement dit, à partir d'une seconde, les forces fluctuantes mesurées ont deux origines possibles : thermiques et biologiques.

Pour visualiser l'écart entre les deux spectres de forces, il est utile de tracer leur quotient et de définir une température effective dépendant de la fréquence  $T_{\text{eff}}(s)$  (voir section 1.2.2). Cette fonction est, en quelque sorte, la température fictive <sup>6</sup> que le même système à l'équilibre aurait eue s'il avait été soumis à des forces d'origine thermique identiques à celles mesurées expérimentalement via  $\hat{S}_f(s)$ . Une autre façon de le voir est d'écrire l'énergie  $E_{\text{sys}}$  du système nécessaire pour faire fluctuer la sonde telle que  $E_{\text{sys}}(s) = k_B T_{\text{eff}}(s)$  où  $k_B$ est la constante de Boltzmann. De plus, on définit une fonction  $\theta(s)$  qui est égale à l'unité si le système est à l'équilibre et supérieure dans le cas contraire :

$$\theta(s) = \frac{\hat{S}_f(s)}{\hat{S}_{feq}(s)} = \frac{T_{eff}(s)}{T}.$$
(3.7)

La fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$ , représentée sur la figure 3.6 droite, est égale à l'unité pour les hautes fréquences, ce qui signifie que le système se trouve à l'équilibre et s'écarte de l'unité aux temps longs pour atteindre des températures effectives plus de dix fois supérieures à la température du bain.

<sup>6.</sup> Le mot fictif signifie que cette température, dépendant de la fréquence, n'est pas une véritable variable thermodynamique.


**FIGURE 3.6** – À gauche, le spectre des forces mesuré  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein rouge) et le spectre des forces  $\hat{S}_{feq}(s)$  à l'équilibre (trait bleu pointillé) sont tracés en fonction de la fréquence *s* pour l'exemple témoin. À droite, la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  est représentée pour l'exemple témoin.

# 3.3 Effets de la variation de la concentration de ligand entre la sonde et le cortex

#### 3.3.1 Nombre de liens bille-cellule



**FIGURE 3.7** – Vision artistique du recouvrement de la sonde par les peptides RGD. La bille est recouverte de RGD avec une concentration dite RGD 1/10, deux fois plus concentrée en RGD que la concentration RGD 1/20 (de même pour la différence entre RGD 1/40 et RGD 1/20). Les rapports de concentration de ligand ne sont pas respectés sur le dessin.

Il est possible de changer le nombre de ligands reliant la bille à la cellule en variant la concentration de peptides RGD initialement disponibles (voir protocole B.1.1 et section 2.3.4), c'est-à-dire en recouvrant plus ou moins la surface de la sonde avec les peptides RGD (figure 3.7). Ceci est vrai si l'on suppose que la densité de ligand adsorbée sur la surface de la bille est proportionnelle à la densité de ligand en solution et à la densité de liens entre les peptides RGD et les intégrines. Par la suite, nous noterons RGD 1/10 les résultats des expériences faites avec une densité de RGD dix fois inférieure à la densité disponible dans la solution « stock », RGD 1/20 lorsqu'elle est vingt fois inférieure et RGD 1/40 pour quarante fois inférieure. En supposant que l'adsorption des peptides RGD soit totale lors de la préparation des billes, nous pouvons quantifier la masse moyenne de peptides par bille :

- pour la concentration RGD 1/10, il y a 40  $\mu$ g de peptide/mg de bille;
- pour la concentration RGD 1/20, il y a 20  $\mu$ g de peptide/mg de bille ;
- pour la concentration RGD 1/40, il y a 10  $\mu$ g de peptide/mg de bille.

Enfin, pour toutes les courbes de cette partie, la couleur **noire** servira aux expériences sur des sondes recouvertes avec une concentration de **RGD 1/10**, la couleur **bleue** pour des sondes **RGD 1/20** et la couleur **rouge** pour des sondes **RGD 1/40**.

La partie qui suit présente donc les effets de la variation de la concentration de ligand entre la bille et le cortex d'actine. Il est important de noter que toutes les mesures de cette partie sont effectuées à température ambiante, le poste expérimental étant à l'origine démuni de système de thermalisation. L'effet de la température sera d'ailleurs étudié dans le chapitre 4.

#### 3.3.2 Fluctuations passives

La figure 3.8 montre les différentes mesures et leurs moyennes géométriques du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  pour les différentes quantités de ligand testées. La moyenne est faite sur un nombre de mesures *N* tel que  $N_{1/10} = 66$ ,  $N_{1/20} = 77$  et  $N_{1/40} = 122$ . Les trois courbes moyennes tracées sur la figure 3.9 sont toutes composées de deux régimes :

- un comportement sous-diffusif aux temps courts ( $\tau \lesssim 1$  s) où  $\Delta R^2(\tau) \sim A_1(\tau/\tau_0)^{\alpha_1}$  avec  $\alpha_1 < 1$ ;
- un comportement sur-diffusif aux temps longs ( $\tau \gtrsim 1$  s) où  $\Delta R^2(\tau) \sim A_2(\tau/\tau_0)^{\alpha_2}$ avec  $\alpha_2 > 1$ .

Cependant, des différences existent entre ces trois types de mesures. Aux temps courts, bien que l'exposant de la loi de puissance semble être sensiblement le même, des variations au niveau de l'amplitude du déplacement quadratique moyen sont flagrantes ( $A_1^{1/10} < A_1^{1/20} < A_1^{1/40}$ ). Aux temps longs, le régime apparaît d'autant plus sur-diffusif que la bille est solidement attachée ( $\alpha_2^{1/10} > \alpha_2^{1/20} > \alpha_2^{1/40}$ ). De plus, le temps de transition  $\tau$  entre les deux régimes se décale vers les temps longs à mesure que la sonde se détache de la cellule ( $\tau_{1/10} < \tau_{1/20} < \tau_{1/40}$ ).

À la lumière de ces observations nous pouvons donner les premiers éléments d'interprétation. Aux temps courts, on remarque que plus la bille est attachée, plus ses mouvements sont confinés par le réseau d'actine. Aux temps longs, plus la bille est reliée au cortex d'actine, plus son mouvement est dirigé. La sonde pour des fortes concentrations en RGD est peut-être plus sensible au travail des forces d'origine biologique ayant lieu dans le cytosquelette

#### 3.3.3 Statistiques sur le déplacement quadratique moyen

#### Méthode d'analyse du déplacement quadratique moyen

Afin d'affiner l'analyse des mesures de microrhéologie passive, il est nécessaire d'effectuer l'ajustement de chaque déplacement quadratique moyen mesuré pour chaque régime (sous-diffusif et sur-diffusif) avec une loi de puissance de la forme  $At^{\alpha 7}$ . Seulement, la plage temporelle de chaque régime est inconnue et ne doit pas être un paramètre arbitraire. Pour systématiser notre analyse, nous avons mis en place un algorithme basé sur l'erreur d'ajustement.

Pour le régime sous-diffusif (temps courts) un ajustement en loi de puissance est instauré sur l'intervalle de temps  $[\tau_1, \tau'_1]$ , puis sur  $[\tau_1, \tau'_1 + \Delta \tau]$ , puis  $[\tau_1, \tau'_1 + 2\Delta \tau]$ , ..., puis  $[\tau_1, \tau'_1 + n\Delta \tau]$  et ainsi de suite. À chaque pas, le résidu d'ajustement est gardé en mémoire et l'écart-type  $R(n\Delta \tau)$  de chaque résidu est calculé,

$$R(n\Delta\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left( \Delta R^2(\tau_i) - A \tau_i^{\alpha} \right)^2, \qquad (3.8)$$

où N est le nombre de points utilisés pour l'ajustement, A et  $\alpha$  sont respectivement le préfacteur et la puissance issus de l'ajustement. Ensuite, nous définissons l'erreur  $E(n\Delta \tau)$  telle que

$$E(n\Delta\tau) = \frac{R(n\Delta\tau)}{\sqrt{N}}.$$
(3.9)

L'ajustement idéal du régime sous-diffusif se fera sur l'intervalle  $[\tau_1, \tau'_1 + m\Delta\tau]$  pour lequel la fonction erreur est minimale :  $E(m\Delta\tau) = \min(E(n\Delta\tau))$ . La fonction  $R(n\Delta\tau)$  est communément utilisée pour quantifier la qualité d'un ajustement, nous utilisons la fonction  $E(n\Delta\tau)$  qui favorise les ajustements avec un plus grand nombre de points, sinon nous aurions toujours le meilleur ajustement sur l'intervalle le plus petit c'est à dire  $[\tau_1, \tau'_1]$ . Pour l'ajustement du comportement sur-diffusif, nous procédons de la même manière sur les intervalles  $[\tau'_2 - n\Delta\tau, \tau_2]$ .  $\tau_1$  pour les temps courts et  $\tau_2$  pour les temps longs sont des paramètres fixes pris respectivement à 0.008 s et 30 s. La figure 3.10 gauche représente les fonctions  $E(n\Delta\tau)$  pour les deux régimes de l'exemple témoin de la partie 3.2, ces fonctions admettent un minimum qui permet de définir les intervalles d'ajustement et de trouver les lois de puissance de  $\Delta R^2(\tau)$  (figure 3.10 droite). La loi de puissance aux temps courts est  $A_1(\tau/\tau_0)^{\alpha_1}$  et aux temps longs  $A_2(\tau/\tau_0)^{\alpha_2}$ , ce qui nous permet de définir le temps de

<sup>7.</sup> En réalité, il faut faire un ajustement de la forme  $A(\tau/\tau_0)^{\alpha}$  afin de toujours exprimer le préfacteur A dans les mêmes unités que le déplacement quadratique moyen, c'est-à-dire une longueur au carré. La valeur de  $\tau_0$  est prise arbitrairement égale à 1 s.



**FIGURE 3.8** – Les différentes mesures du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  et leurs moyennes géométriques pour trois quantités différentes de ligand bille-cellule, en haut à gauche RGD 1/10, en haut à droite RGD 1/20 et en bas RGD 1/40. Ces moyennes sont faites pour un nombre de mesures *N* tel que  $N_{1/10} = 66$ ,  $N_{1/20} = 77$  et  $N_{1/40} = 122$ .



**FIGURE 3.9** – Moyenne géométrique du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  pour trois quantités différentes de ligand bille-cellule. Ces moyennes sont faites pour un nombre de mesures *N* tel que  $N_{1/10} = 66$ ,  $N_{1/20} = 77$  et  $N_{1/40} = 122$ . Les temps  $\tau_{1/10}$ ,  $\tau_{1/20}$  et  $\tau_{1/40}$  sont les temps de transition entre le régime sous-diffusif et sur-diffusif pour les concentration RGD 1/10, RGD 1/20 et RGD 1/40.

transition entre le régime sous-diffusif et le régime sur-diffusif  $\tau^*$  tel que

$$\tau^* = \left(\frac{A_2}{A_1}\right)^{\frac{1}{\alpha_1 - \alpha_2}}.\tag{3.10}$$

#### Résultat de l'analyse

L'analyse de chaque déplacement quadratique moyen permet de mesurer cinq grandeurs pour chaque expérience :

- $A_1$  et  $\alpha_1$ , respectivement le préfacteur (en nm<sup>2</sup>) et l'exposant de la loi de puissance dans le régime sous-diffusif;
- $A_2$  et  $\alpha_2$ , respectivement le préfacteur (en nm<sup>2</sup>) et l'exposant de la loi de puissance dans le régime sur-diffusif;
- $-\tau^*$  le temps de transition entre ces deux régimes.

La figure 3.11 représente les distributions cumulées de ces grandeurs. Pour avoir une idée de la forme des distributions et de leurs écarts à la gaussienne, ces distributions cumu-



**FIGURE 3.10** – À gauche, la fonction d'erreur d'ajustement de la loi de puissance en fonction de la longueur de l'intervalle qui admet un minimum. À droite, un exemple d'ajustement par deux lois de puissance du régime sous-diffusif et du régime sur-diffusif. Les intervalles de temps de cet ajustement sont déterminés par le minimum de la fonction d'erreur de l'ajustement. Pour cet exemple, à  $\tau_0 = 1$  s,  $A_1 \approx 52$  nm<sup>2</sup>,  $\alpha_1 \approx 0.23$ ,  $A_2 \approx 19$  nm<sup>2</sup>,  $\alpha_1 \approx 1.35$ . Il en résulte  $\tau^* \approx 2.5$  s.

lées expérimentales sont ajustées avec la distribution cumulée théorique d'une loi normale p(x):

$$p(x) = \frac{1}{2} \left( 1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x - \langle x \rangle}{\sigma\sqrt{2}}\right) \right) = \frac{1}{2} + \frac{1}{\sigma\sqrt{2}} \int_{0}^{x} \exp\left(\frac{y - \langle x \rangle}{2\sigma^{2}}\right) dy.$$
(3.11)

Ceci nous permet de voir que les préfacteurs  $A_1$  et  $A_2$  ainsi que les temps de transition  $\tau^*$  semblent être distribués selon une loi log-normale (le logarithme est distribué normalement). Ce résultat, pour les préfacteurs, est connu dans la littérature ([26, 50]). Cependant, il n'est pas évident que le temps  $\tau^*$  suive une distribution log-normale<sup>8</sup>. L'origine de ces distributions larges n'est pas connue mais elle reflète la variété des processus en œuvre dans les cellules, notamment l'hétérogénéité du nombre de liens entre la sonde et la cellule. La distribution des exposants  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  s'approche d'une loi normale. On remarque toutefois que les exposants  $\alpha_2$  de la partie sur-diffusive (réprésentés par des triangles en bas à gauche de la figure 3.11) s'écartent de la distribution gaussienne théorique quand les valeurs de  $\alpha_2$  sont trouvées inférieures à l'unité<sup>9</sup>. Ceci est d'autant plus vrai que la densité de RGD est faible, notamment pour la concentration RGD 1/40 où l'ajustement de la distribution cumulée avec une fonction erreur est grandement influencée par les exposants inférieurs à 1. En ne prenant que  $\alpha_2 > 1$ , nous retrouvons un bon ajustement avec la loi

<sup>8.</sup> En effet, il n'est pas trivial que le logarithme du quotient de deux variables aléatoires  $A_1/A_2$  suivant des distributions log-normales, mis à la puissance de l'inverse de la différence de deux variables aléatoires  $\alpha_1 - \alpha_2$  que l'on peut supposer gaussiennes (équation 3.10), soit distribué normalement.

<sup>9.</sup> Le régime sur-diffusif est justement caractérisé par un exposant supérieur à 1.

normale, mais ce ne serait pas correct de les retirer arbitrairement de notre statistique car ils contribuent, eux aussi, au comportement des fluctuations de la bille aux temps longs.

Comme annoncé au paragraphe précédent, l'amplitude du déplacement quadratique moyen aux temps courts, pour le régime sous-diffusif, est fortement dépendante de la densité de ligand :

- pour la concentration RGD 1/10 :  $\overline{A_1}^{1/10} = 34 \pm 4 \text{ nm}^2$ ; - pour la concentration RGD 1/20 :  $\overline{A_1}^{1/20} = 78 \pm 8 \text{ nm}^2$ ; - pour la concentration RGD 1/40 :  $\overline{A_1}^{1/40} = 301 \pm 46 \text{ nm}^2$ .

L'exposant  $\alpha_1$  dans ce domaine temporel dépend peu de la densité de RGD :

- pour la concentration RGD 1/10 :  $\overline{\alpha_1}^{1/10} = 0.32 \pm 0.02$ ; pour la concentration RGD 1/20 :  $\overline{\alpha_1}^{1/20} = 0.24 \pm 0.01$ ;
- pour la concentration RGD 1/40 :  $\overline{\alpha_1}^{1/40} = 0.31 \pm 0.01$ .

Aux temps longs, l'exposant  $\alpha_2$  augmente significativement en fonction de la densité de RGD:

$$\overline{\alpha_2}^{1/10} = 1.6 \pm 0.03 > \overline{\alpha_2}^{1/20} = 1.38 \pm 0.05 > \overline{\alpha_2}^{1/40} = 1.19 \pm 0.04.$$

Le préfacteur  $A_2$  a le même comportement que dans le régime sous-diffusif et diminue pendant que la densité de RGD augmente :

$$\overline{A_2}^{1/10} = 47 \pm 9 \text{ nm}^2 < \overline{A_2}^{1/20} = 52 \pm 10 \text{ nm}^2 < \overline{A_2}^{1/40} = 133 \pm 25 \text{ nm}^2.$$



**FIGURE 3.11** – Distributions cumulées de grandeurs issues des ajustements des régimes sous et sur-diffusif des déplacements quadratiques moyens  $\Delta R^2(\tau)$ . Aux temps courts,  $\Delta R^2(\tau) = A_1 \tau^{\alpha_1}$  et aux temps longs  $\Delta R^2(\tau) = A_2 \tau^{\alpha_2}$ . Les indices 1/10, 1/20 et 1/40 font référence à la densité de ligand entourant la sonde. Les distributions cumulées sont ajustées avec la fonction p(x) (équation 3.11) afin de visualiser leurs écarts à la distribution normale (ou log-normale quand x est le logarithme de la grandeur étudiée).

#### Discussion et modèle de la cage

L'amplitude des fluctuations aux temps courts dépend de la densité de ligand : plus la concentration en peptide RGD est grande, plus le préfacteur  $A_1$  de la partie sous-diffusive est petit, et donc plus le mouvement de la sonde est confiné. L'augmentation de la densité de ligand multiplie le nombre d'attaches avec le cytosquelette. En effet, la visualisation de l'actine par un marquage immunofluorescent montre la formation d'un anneau d'actine autour des billes recouvertes d'une forte densité de ligand (RGD 1/1) contrairement à celles entourées de peu de ligand [49]. Ceci qui a pour effet de diminuer la liberté de mouvement de la sonde. Comme nous le verrons plus tard, il est utile de visualiser que les filaments d'actine accrochés à la sonde agissent comme un potentiel de raideur k piégeant la sonde dans une cage de taille a. À mesure que le nombre de filaments augmente, la raideur augmente et l'espace libre autour de la bille rétrécit, diminuant ainsi la taille de la cage et par la même occasion l'amplitude des fluctuations de la sonde. L'exposant  $\alpha_1$  ne semble pas dépendre de la concentration de ligand, aucune étude antérieure ne permet d'infirmer ou de confirmer ce résultat. La plupart des articles sur le sujet n'étudient que la valeur de l'exposant dans la partie sur-diffusive.



**FIGURE 3.12** – À gauche, les valeurs de  $\alpha_2$  [13] pour des billes recouvertes de LDL (en violet) et de RGD (en vert). Les points rouges, bleus et noirs correpondent à nos résultats pour respectivement des billes RGD 1/40, RGD 1/20, RGD 1/10, les barres représentent les erreurs standards. À droite, même chose qu'à gauche pour le préfacteur  $A_2$ . Courbe adaptée de [13] à l'aide du logiciel PlotDigitizer (www.plotdigitizer.sourceforge.net).

Bursac *et al.* [13] étudient le comportement du déplacement quadratique moyen dans le régime sur-diffusif de micro-billes entourées de différentes quantités de RGD et de ligand LDL. Le LDL est une protéine qui se lie à des récepteurs libres de la membrane et ne crée *a priori* aucune attache au cytosquelette d'actine. À l'aide d'un ajustement du type

 $\Delta R^2(\tau) = A_2 \tau^{\alpha_2}$ , ils observent que l'exposant  $\alpha_2$  et le préfacteur  $A_2$  dépendent tous deux largement de la quantité de RGD, contrairement aux billes recouvertes de LDL. Ce résultat important implique que le comportement des billes dans le régime sur-diffusif est dû aux forces exercées par l'actine corticale ou par son intermédiaire et non par des phénomènes localisés dans la membrane. La figure 3.12 montre les résultats de l'exposant moyen  $\alpha_2$  et du préfacteur moyen A<sub>2</sub> pour le travail de Bursac et al.. Afin de comparer nos données avec les leurs, nous avons tracé, sur la même figure 3.12, les exposants et les préfacteurs issus de nos mesures <sup>10</sup>. Malgré deux systèmes biologiques différents <sup>11</sup>, nos résultats sont en accord avec les leurs : l'exposant  $\alpha_2$  augmente et le préfacteur  $A_2$  diminue quand la densité de ligand augmente. La dépendance de l'exposant  $\alpha_2$  en fonction de la densité de ligand signifie que plus la bille est ancrée dans le cortex d'actine, plus l'effet des forces agissant dans celui-ci se fera ressentir. La cage évoquée précédemment peut avoir en moyenne, aux temps longs, une vitesse v venant des forces actives s'exerçant dans la cellule dues par exemple au travail coordonné des moteurs moléculaires. Plus la densité de ligand est grande, plus la cage est petite et plus la sonde suit le mouvement de la cage, et donc tend, pour une cage infiniment petite, vers un mouvement balistique  $1^{12}$ .

Le temps de transition entre les deux régimes, défini par l'équation 3.10, dépend aussi de l'ancrage de la sonde au cytosquelette. La distribution cumulée de ces temps est représentée en bas à droite de la figure 3.11. Le temps de transition augmente quand on diminue la quantité de RGD :

$$\overline{ au}_{1/10} = 0.8 \pm 0.1 \text{ s} < \overline{ au}_{1/20} = 1.7 \pm 0.2 \text{ s} < \overline{ au}_{1/40} = 2.5 \pm 0.2 \text{ s}.$$

Pour comprendre cette dépendance, nous pouvons reprendre l'idée d'une sonde piégée dans un potentiel de raideur k, plus la bille est ancrée à la cellule, plus la raideur du potentiel est grande. Cela veut également dire que la sonde, en équilibre dans ce puits, sera confinée dans une cage de taille a définie par la largeur du potentiel à la hauteur  $k_BT$  (figure 3.13). De plus, des forces agissent sur cette cage qui se déplace alors à une vitesse  $\vec{v}$ . Dans ce système, cette sonde aura trois régimes différents. Un régime diffusif pour des temps  $\tau_0$ inférieurs à la durée que met la sonde à parcourir les deux bords de la cage, soit  $\tau_0 = a^2/D$ où D est la constante de diffusion de la bille dans le liquide de la cage. Le déplacement quadratique moyen de ce type de régime, présenté figure 3.13, est une fonction linéaire. Pour des temps compris entre  $\tau_0$  et  $\tau^*$ , le déplacement quadratique moyen est une constante qui vaut le carré de la taille de la cage  $a^2$ . Lorsque la cage a parcouru une distance de l'ordre de sa taille, alors le régime devient balistique et arrive au temps  $\tau^* = a/v$ . Le déplacement quadratique moyen de la bille est une fonction quadratique du temps :  $\Delta R^2(\tau) = v^2 \tau^2$ . Ce petit modèle, bien que peu réaliste, nous permet de comprendre la dépendance temporelle du temps de transition  $\tau^* = a/v$  qui diminue avec la taille de la cage et donc quand la

<sup>10.</sup> Dans l'article de Bursac *et al.* [13], la densité de ligand est exprimée en ng de RGD /mg de bille. C'est une erreur de leur part, il faut l'exprimer en  $\mu$ g de RGD /mg de bille (les articles de référence [79, 21, 28] de leur protocole donnent une concentration en  $\mu$ g de RGD /mg de bille).

<sup>11.</sup> Nous utilisons des myoblastes C2C12 loin de la confluence, Bursac *et al.* travaillent sur des cellules ASM, « adult smooth muscle », en confluence. De surcroît, leur sonde est une bille de 4.5  $\mu$ m de diamètre.

<sup>12.</sup> Un mouvement balistique implique que l'exposant  $\alpha_2 = 2$ .



**FIGURE 3.13** – Modèle de cage de déplaçant à une vitesse  $\vec{v}$ . La sonde accrochée aux filaments d'actine s'apparente à un objet en mouvement brownien dans un puit de potentiel de raideur *k*. Plus la bille est ancrée dans le cortex d'actine, plus la raideur du piège est grande :  $k_{1/10} > k_{1/20} > k_{1/40}$ . Cela peut se traduire par le fait que la sonde est en mouvement brownien dans une cage de dimension *a* correspond à la largeur du puit à la hauteur  $k_BT$ . Les grandeurs  $a_{1/10}$ ,  $a_{1/20}$ ,  $a_{1/40}$ ,  $\tau_{1/10}$ ,  $\tau_{1/20}$  et  $\tau_{1/40}$  correspondent respectivement aux tailles de cages et aux temps de transition entre le plateau et le régime balistique pour les concentrations RGD 1/10, RGD 1/20, RGD 1/40.

densité de ligand augmente. La valeur de la vitesse  $v = a/\tau^*$  de la cage est une grandeur que l'on peut extraire à partir des valeurs calculées précédemment :

- $v_{1/10} \approx 7 \text{ nm/s};$
- $-v_{1/20} \approx 6 \text{ nm/s};$
- $-v_{1/40} \approx 8 \text{ nm/s}.$

Ces trois valeurs sont étonnamment proches comme si la vitesse de déplacement de la cage ne dépendait pas du nombre de liens entre la bille et la cellule. On trouve donc une vitesse  $v \approx 0.4 \ \mu m/min$ , valeur à comparer à la vitesse de polymérisation de l'actine qui est de l'ordre du  $\mu m/min$ . Cependant ce modèle est très limité car il ne correspond pas à nos mesures, nous n'avons pas un comportement balistique avec  $\alpha_2 = 2$  aux temps longs mais plutôt un comportement sur-diffusif avec  $1 < \alpha_2 < 2$  et de même aux temps courts, nous n'avons pas un plateau mais un comportement sous-diffusif.



#### 3.3.4 Mesure de la fonction de réponse viscoélastique

**FIGURE 3.14** – Les différentes mesures des transformées de Laplace des fonctions de réponse  $\hat{J}(s)$  et leurs moyennes géométriques sont tracées en fonction de la fréquence pour différentes quantités de ligand : RGD 1/10 (noir), RGD 1/20 (bleu), RGD 1/40 (rouge). Les moyennes sont faites sur un nombre de mesures N tel que :  $N_{1/10} = 43$ ,  $N_{1/20} = 39$ ,  $N_{1/40} = 37$ .

Afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation des forces s'exerçant sur la bille, il faut effectuer des mesures de microrhéologie active sur les sondes. La figure 3.14 et la figure 3.15 gauche présentent les différentes mesures et les moyennes géométriques des fonctions de réponse  $\hat{J}(s)$  mesurées pour les trois concentrations de ligand. Le nombre de mesures N pour chaque moyenne est :  $N_{1/10} = 43$ ,  $N_{1/20} = 39$ ,  $N_{1/40} = 37$ . L'amplitude des fonctions de réponse semble fortement dépendante de la concentration en RGD. La fonction de réponse est d'autant plus grande que l'on diminue le nombre d'accroches au cortex. De plus, elle a un comportement en loi de puissance que l'on peut ajuster avec une fonction du type :  $\hat{J}(s) = J'_0 s^{\beta'}$ . Ceci nous permet d'extraire la fonction de réponse dans le domaine temporel, tel que  $J(t) = J_0 t^{\beta}$  où  $J'_0 = J_0 \phi (1 + \beta)$  et  $\beta' = -\beta - 1$ . Toutes les données n'étant pas parfaitement des lois de puissance sur l'ensemble de la gamme, l'ajustement est fait sur une gamme de 0.5 Hz à 50 Hz. Ce choix est complètement arbitraire, il est simplement dû au fait que les ajustements sur des gammes plus grandes aboutissaient à des lois favorisant notamment les temps longs. Les distributions cumulées de  $J_0$  et  $\beta$  sont représentées



**FIGURE 3.15** – À gauche, les moyennes géométriques des transformées de Laplace des fonctions de réponse  $\hat{J}(s)$  sont tracées en fonction de la fréquence pour différentes quantités de ligand : RGD 1/10 (noir), RGD 1/20 (bleu), RGD 1/40 (rouge). Afin de quantifier les fonctions de réponse, chaque courbe participant aux moyennes est ajustée avec une loi de puissance. À droite, les moyennes géométriques des déplacements quadratiques  $\Delta x^2(\tau)$  correspondant aux mêmes billes et dans la même direction d'application de la force que les mesures des fonctions de réponse de la figure de gauche. La ligne grise en pointillé est la zone où le déplacement quadratique moyen d'une bille fixée au cortex avec une densité de ligand RGD 1/10 se rapproche de la limite de la résolution du système expérimental. Les moyennes sont faites sur un nombre de mesures *N* telle que :  $N_{1/10} = 43$ ,  $N_{1/20} = 39$ ,  $N_{1/40} = 37$ .

figure 3.16. Le préfacteur  $J_0$  a suit une distribution log-normale qui a été plusieurs fois remarqué [26, 50] et dépend significativement de la quantité de RGD :

$$\overline{J_0}^{1/10} = 0.9 \pm 0.2 \text{ nm/pN} < \overline{J_0}^{1/20} = 4.2 \pm 0.8 \text{ nm/pN} < \overline{J_0}^{1/40} = 14.9 \pm 3.5 \text{ nm/pN}.$$

Cela signifie que plus la bille est accrochée au réseau, plus il est difficile de la déplacer pour une force donnée, en d'autres termes, plus le milieu sondé est rigide. Ce résultat est en accord avec l'idée du puits de potentiel de raideur *k* augmentant avec la densité de RGD. Il est difficile de comparer ces valeurs avec la littérature car nous n'avons pas accès aux paramètres géométriques permettant de connaître la déformation du milieu accroché à la sonde et la contrainte exercée à chaque instant (voir section 1.2.2), mais on retrouve cette tendance dans le peu d'études sur le sujet [13, 49]. La distribution des exposants  $\beta$  n'est pas une gaussienne parfaite (figure 3.16), elle semble avoir une longue queue pour les grands exposants. L'exposant  $\beta$  ne semble pas dépendre de la densité de ligand :

$$\overline{\beta}_{1/10} = 0.2 \pm 0.02 \approx \overline{\beta}_{1/20} = 0.19 \pm 0.02 < \overline{\beta}_{1/40} = 0.25 \pm 0.03.$$

De façon intéressante, les articles de Balland et al. [7] et de Hoffmann et al. [48] trouvent

aussi des exposants  $\beta \approx 0.2$  pour des expériences de microrhéologie différentes et des types cellulaires différents (voir section 1.3.3).



**FIGURE 3.16** – Distributions cumulées des grandeurs issues des ajustements des fonctions de réponses  $\hat{J}(s) = J'_0 s^{\beta'} = J_0 \phi (1 + \beta) s^{-\beta - 1}$ . Les indices 1/10, 1/20 et 1/40 font référence à la densité de ligand entourant la sonde. Les distributions cumulées sont ajustées avec la fonction p(x) (équation 3.11) afin de visualiser leurs écarts à la distribution normale (ou log-normale quand x est le logarithme de la grandeur étudiée).

#### 3.3.5 Calcul de la fonction de corrélation des forces

Il s'agit maintenant de comparer ces mesures actives aux mesures passives. Seulement, il est nécessaire de prendre les mesures passives dans la même direction que celle d'application de la force (voir section 1.2.2). La figure 3.15 droite trace la moyenne géométrique des déplacements quadratiques moyens  $\Delta x^2(\tau)$  calculés pour les mêmes sondes et dans la même direction que l'application de la force. Cette moyenne se fait donc sur un nombre de mesures identiques aux mesures actives ( $N_{1/10} = 43$ ,  $N_{1/20} = 39$ ,  $N_{1/40} = 37$ ) et présente une allure similaire aux  $\Delta R^2(\tau)$  de la figure 3.9 avec quelques différences. Le niveau de l'amplitude de  $\Delta R^2(\tau)$  est la somme des déplacements quadratiques moyens dans chaque direction contrairement à  $\Delta x^2(\tau)$  qui n'est que dans une seule direction. L'amplitude est donc environ divisée par deux. De plus, les billes recouvertes d'une concentration RGD 1/10 ont une amplitude aux temps courts à la limite de la résolution pour les temps  $\tau < 0.2$  s <sup>13</sup>(mesurée expérimentalement à 4 nm<sup>2</sup> et détaillée à la section 2.4.3). Les exposants  $\alpha_2$ , de la partie sur-diffusive sont aussi différents mais varient de la même façon en

<sup>13.</sup> Il est vrai que la question se pose en des termes identiques pour les amplitudes des  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  dans le régime sous-diffusif à la concentration RGD 1/10 pour lesquelles la limite expérimentale se situe à 8 nm<sup>2</sup>.

fonction de la densité de ligand :  $\overline{\alpha_2}^{1/10} \approx 1.5 > \overline{\alpha_2}^{1/20} \approx 1.2 > \overline{\alpha_2}^{1/40} \approx 1.1$ . Il en résulte des temps de transition légèrement différents :  $\overline{\tau}_{1/10} \approx 0.7 \text{ s} < \overline{\tau}_{1/20} \approx 1.4 \text{ s} < \overline{\tau}_{1/40} \approx 2.2 \text{ s}$ .

#### Spectres des forces

En combinant chaque mesure de microrhéologie active et passive, nous pouvous calculer le spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  s'exerçant sur la bille, c'est-à-dire la transformée de Laplace de la fonction d'autocorrélation des forces.

En utilisant le théorème de fluctuation-dissipation, notre approche nous donnent la possibilité de prédire ce que serait le spectre des forces si le système était à l'équilibre. Plus exactement, cela permet de calculer la fonction d'autocorrélation des forces s'exerçant sur la sonde pour un système à l'équilibre qui aurait une réponse viscoélastique identique. Les courbes en pointillés de la figure 3.17 gauche représentent le spectre des forces à l'équilibre  $S_{feq}(s)$  pour les trois concentrations de ligand. Ce sont des lois de puissance directement reliées aux lois de puissance de la réponse viscoélastique. La fonction de corrélation des forces thermiques exercées sur une particule brownienne dans un fluide newtonien est un Dirac, sous-entendant que la force à un instant *t* ne dépend pas des forces aux instants antérieurs. Dans notre cas, la présence d'un noyau mémoire dans la réponse linéaire de notre matériau (voir section 1.2.1) implique que la fonction de corrélation a une dépendance temporelle (et donc fréquentielle).

L'analyse des fonctions de réponse de la section 3.3.4 a permis de remarquer que plus la bille est ancrée dans la cellule, plus le milieu que l'on sonde est rigide, et plus le spectre des forces à l'équilibre a une grande amplitude. C'est exactement le comportement que l'on retrouve sur la figure 3.17 gauche (traits pointillés).

Les traits pleins de cette même figure représentent le spectre réel des forces mesurées  $\hat{S}_f(s)$ . Il apparaît deux régimes reflétant le comportement sous-diffusif puis sur-diffusif de la trajectoire de la sonde. Le premier, aux temps courts, a à la fois la même amplitude et la même dépendance fréquentielle que  $\hat{S}_f eq(s)$  excepté pour la concentration RGD 1/10. Ce qui signifie que les forces s'exerçant sur la bille sur cet intervalle de temps sont d'origine thermique. La ligne grise pointillée de la figure 3.17 gauche est le spectre des forces calculé sur tout l'intervalle de temps du déplacement quadratique moyen, prenant donc en compte les temps très courts pour lesquels les fluctuations mesurées sont à la limite de la résolution spatiale. On voit que le spectre des forces se situe légèrement au-dessus du spectre à l'équilibre. Néanmoins, si l'on coupe les temps courts à 0.2 s et que l'on recalcule le spectre des forces dans l'intervalle [0.4 Hz, 5 Hz] (courbe noire à trait plein), on s'aperçoit que le spectre des forces a tendance à s'approcher de celui de l'équilibre. Ceci est une hypothèse émise à la lumière des spectres de forces pour une bille attachée avec une densité RGD 1/20 et RGD 1/40. Un petit calcul nous permet de prévoir l'amplitude qu'aurait le déplacement quadratique dans un système à l'équilibre ayant une fonction de réponse identique à celle mesurée pour la concentration RGD 1/10 : à 10 Hz,  $\Delta x_{eq}^2(\tau = 0.1 \text{ s}) \approx 4 - 5 \text{ nm}^2$  qui est en deçà de notre résolution spatiale. Toutefois, il n'est pas possible d'exclure complètement la possibilité de forces non-thermiques menant le système en dehors de l'équilibre aux temps courts. Sur la figure 3.17 droite, la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  montre que pour les



**FIGURE 3.17** – À gauche : les traits pleins représentent la moyenne géométrique du spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  calculé à partir de la combinaison des microrhéologies passive et active et les traits pointillés représentent le spectre des forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  calculé à partir de la mesure de microrhéologie active en utilisant le théorème de fluctuation-dissipation. À droite, la moyenne de la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  est tracée en fonction de la fréquence *s*, les traits pointillés fins représentent l'erreur standard. Les courbes rouges sont calculées à partir de mesures effectuées sur une bille recouverte d'une concentration RGD 1/40, les bleues d'une concentration RGD 1/20 et les noires d'une concentration RGD 1/10. Les courbes grises en pointillé sont le résultat du calcul du spectre des forces sur toute la gamme de fréquences disponibles alors que les courbes noires pleines sont calculées sur la gamme [0.4 Hz, 5 Hz] (voir figure 3.15). Les moyennes sont faites sur un nombre de mesures *N* tel que :  $N_{1/10} = 43$ ,  $N_{1/20} = 39$ ,  $N_{1/40} = 37$ .

hautes fréquences sa valeur est voisine de 1 pour les densités RGD 1/20 et 1/40, signature d'un système à l'équilibre. Pour la concentration RGD 1/10, la ligne grise en pointillés <sup>14</sup> sature à  $\theta(s) \approx 2$  mais la courbe noire montre un comportement qui pourrait s'approcher de l'équilibre.

Le second régime, aux temps longs, est caractérisé par un écart du spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  avec le spectre des forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  en fonction de la fréquence. En visualisant la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$ , on voit que cet écart est d'autant plus grand que la bille est plus ancrée à l'actine corticale. Ce résultat indique que plus la bille est accrochée, plus elle est sensible aux forces stochastiques d'origine biologique. Ceci peut être cohérent avec l'idée que des moteurs moléculaires exercent des forces sur les filaments d'actine liés à la sonde : plus il y a de liens entre la bille et le cortex, plus le nombre de moteurs concernés est grand et plus l'amplitude de la fonction de corrélation est grande. Ce régime est dû au régime sur-diffusif du déplacement quadratique moyen, or celui-ci suit

<sup>14.</sup> Cette ligne grise en pointillés est calculée avec le spectre des forces sur toute la gamme de fréquences disponibles et la ligne noire sur la gamme [0.4 Hz, 5 Hz].

une loi de puissance dont l'exposant dépend de la quantité de ligand. Il en résulte que la dépendance fréquentielle du comportement aux temps longs du spectre des forces dépend aussi de la quantité de ligand. Il est possible de l'ajuster avec une loi de puissance telle que  $\hat{S}_f(s) = c'(s/s_0)^{\gamma'}$  et d'en déduire les valeurs de la fonction de corrélation de la force  $\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t = c(\tau/\tau_0)^{\gamma 15}$ . Pour le préfacteur c homogène à une force au carré nous trouvons pour  $\tau_0 = 1$  s :

$$c_{1/10} \approx 26 \text{ pN}^2 > c_{1/20} \approx 1.5 \text{ pN}^2 > c_{1/40} \approx 0.2 \text{ pN}^2$$

Cela nous donne une idée des moyennes des forces exercées à l'échelle d'une seconde. La valeur de  $\sqrt{c_{1/10}} \approx 5$  pN nous donne un ordre de grandeur à comparer avec la force exercée par une myosine *in vitro* qui est égale à 3 – 4 pN [33]. La valeur de l'exposant semble dépendre de la densité de ligand mais la différence entre l'exposant  $\gamma$  à des concentrations RGD 1/20 et RGD 1/40 n'est pas significative :

$$\gamma_{1/10} \approx 0.9 > \gamma_{1/20} \approx \gamma_{1/40} \approx 0.5.$$

Cette dépendance temporelle peut faire l'objet de quelques interprétations. Car si plus aucun lien n'existe entre la bille et la cellule, on comprend que l'amplitude de la fonction de corrélation des forces puisse augmenter, mais il n'est pas évident que son exposant soit aussi dépendant. Peut-être que les moteurs emmenant le système hors de l'équilibre travaillent de façon coordonnée : plus le nombre de liens augmente, plus le réseau d'actine autour de la bille s'organise, tel un muscle ou un contact focal, et alors plus les myosines travaillent ensemble de façon coordonnée. Le modèle proposé par Robert *et al.* [83, 84] va dans ce sens (voir ci-dessous).

Par ailleurs, cette fonction de corrélation est croissante dans le temps (car  $\gamma > 0$ ), or elle devrait tendre vers une valeur nulle aux temps longs. En effet, au bout d'un intervalle de temps plus long que le temps de mémoire, les fluctuations d'une grandeur statistique finissent toujours par être décorrélées. Quelle est l'origine de ce phénomène de corrélation persistant ? Si l'on faisait des expériences à des temps plus longs pourrait-on retrouver une fonction tendant vers 0 ?

#### Modèle de Robert et al.

Robert *et al.*, par l'utilisation des techniques de microrhéologie passive et active, calculent le spectre des forces exercées sur des endosomes magnétiques (voir section 1.3.4 et figure 1.20). Leur modèle associé suppose que les forces exercées sur les endosomes sont dues aux moteurs moléculaires tels que les kinésines qui génèrent des mouvements le long des microtubules (figure 3.18 gauche). Chaque moteur peut exercer une force  $F_0$  sur un endosome. Pendant un temps  $t_{on}$ , il y a un nombre de moteurs N tirant sur l'endosome. Donc pendant le temps  $t_{on}$ , la force  $F_m = NF_0$  est appliquée à l'endosome. Pour tenir compte des effets collectifs aux temps longs, Robert *et al.* font l'hypothèse que la durée  $t_{on}$  pendant

<sup>15.</sup>  $\gamma' = -\gamma - 1$  et  $c' = c\phi(1 + \gamma)$  où  $\phi$  est la fonction d'Euler.

laquel le créneau de force  $F_m$  est appliqué sur l'endosome suit une distribution en loi de puissance :

$$P(t_{on}) \sim t_{on}^{-x},\tag{3.12}$$

où x est l'exposant de la loi de puissance. Le nombre de moteurs N tirant pendant  $\tau_{on}$  est distribué normalement autour d'une valeur moyenne  $N_m$ . En revanche, ils supposent que le temps  $t_{off}$  entre deux créneaux de force  $F_m$  suit une distribution exponentielle :

$$P(t_{off}) \sim \exp\left(-\frac{t_{off}}{\tau_{off}}\right).$$
 (3.13)

La force F(t) s'exerçant sur l'endosome à l'instant t est caractérisée par deux paramètres de contrôle : la force moyenne d'amplitude  $N_m F_0$  et l'exposant x de la loi de puissance. À l'aide de simulation, ils peuvent calculer le spectre de forces  $\hat{S}_f(\omega)$  tel que :

$$\hat{S}_f(\boldsymbol{\omega}) = \int_0^\infty dt_{on} |F(\boldsymbol{\omega}, t_{on})|^2 P(t_{on}), \qquad (3.14)$$

où  $|F(\omega, t_{on})|^{2}$  le spectre de puissance d'un créneau de force d'une amplitude  $F_m$  et d'une durée  $t_{on}$ . Ces calculs mènent à une dépendance en loi de puissance du spectre des forces telle que :

$$\hat{S}_f(\boldsymbol{\omega}) \propto F_m^2 \boldsymbol{\omega}^{\boldsymbol{\gamma}},\tag{3.15}$$

où  $\gamma' = x - 3$  pour 1 < x < 3.

On voit à partir de cette expression que plus le nombre de moteurs exerçant des forces sur la sonde est grand, plus la force  $F_m$  est grande et plus l'amplitude du spectre des force est grande. Ceci va dans le sens de l'interprétation précédente. L'augmentation de la concentration en RGD augmente le nombre de liens entre la sonde et le cortex cellulaire. Il en résulte que la sonde ressent le travail d'une plus grande quantité de moteurs moléculaires qui, dans notre cas, peuvent être des myosines. On comprend alors que l'amplitude du spectre des forces augmente quand la concentration en RGD augmente.

L'exposant  $\gamma'$  du spectre des forces est directement relié à l'exposant x de la distribution de temps  $t_{on}$ . Or plus x est petit, plus  $\gamma'$  est petit, et plus la probabilité d'avoir une durée longue  $t_{on}$  est grande, c'est-à-dire plus la probabilité que les moteurs moléculaires travaillent pendant une longue durée est grande. Nous avons vu précédemment qu'une augmentation de la concentration en RGD augmente l'exposant de la fonction de corrélation de la force  $\gamma$  (ou diminue l'exposant  $\gamma' = -1 - \gamma$  du spectre des forces). Un façon d'interpréter cela est de supposer que l'augmentation de la densité de ligand implique une organisation du réseau d'acto-myosine autour de la sonde. Il en résulte qu'une plus grande quantité de moteurs moléculaires vont travailler simultanément, dans le même sens, et se coordonner. Si davantage de myosines travaillent dans le même sens, un créneau de force de longue durée, c'est-à-dire un grand  $t_{on}$ , devient plus probable. En effet parmi les myosines liées à une paire de filaments d'actine, la proportion de myosines attachées, c'est-à-dire effectives, sera plus grande pour une durée donnée.

<sup>16.</sup> Le spectre de puissance d'un créneau de force  $F_m$  d'une durée  $\tau_{on}$  est :  $|F(\omega, t_{on})|^2 = 4F_m^2 \sin^2(\omega t_{on}/2)\omega^{-2}$ .



**FIGURE 3.18** – Modèle de Robert *et al.* À gauche, schéma représentant les endosomes magnétiques munis de moteurs moléculaires leurs permettant de se déplacer le long des microtubules. Ces  $N_{moteurs}$  vont exercer une force  $F_m$  pendant  $t_{on}$ . En bas à droite, courbe représentant l'allure des forces F pour des  $t_{on}$  issus d'une distribution en loi de puissance. En haut à droite, les ronds représentent le spectre des forces expérimentales  $\hat{S}_f(\omega)$  mesurées sur des endosomes magnétiques en fonction de la fréquence et les traits noirs représentent le spectre des forces issu de la simulation numérique. Schéma extrait de [83].

#### 3.3.6 De l'équilibre thermodynamiques aux forces d'origines biologiques

La combinaison de deux techniques de microrhéologie nous permet de calculer la fonction d'autocorrélation des forces agissant sur la sonde et de déterminer l'origine de ces forces. Aux temps courts, le spectre des forces est semblable au spectre des forces à l'équilibre, ce qui nous permet d'affirmer que les forces exercées sur la sonde sont d'origine thermique. Nous ne pouvons pas être sûrs de l'absence de forces biologiques mais, s'il y en a, elles sont plus faibles ou du même ordre de grandeur que les forces thermiques. Aux temps longs, nous mesurons un écart du spectre des forces avec le spectre à l'équilibre, ce qui nous permet de déduire que les forces ont une origine autre que thermique, soit biologique. L'observation de cette transition d'un système allant de l'équilibre à hors-équilibre a déjà été faite sur des gels d'acto-myosine *in vitro* [68] et sur des cellules [67]. Le travail de Bursac *et al.* [14] fait référence à cette transition pour des sondes attachées à des cellules en culture *via* les intégrines mais le raisonnement, incomplet, n'est basé que sur la comparaison des exposants des déplacements quadratiques moyens calculés à partir de la microrhéologie passive et active (voir section 1.3.4, figure 1.18B et la note de bas de page 15) et pas sur la comparaison des amplitudes.

En faisant varier la quantité de ligand reliant la sonde à l'actine corticale, nous avons vu un effet significatif sur l'amplitude des forces exercées sur la sonde. Plus la sonde est ancrée dans le cortex, plus elle ressent aux temps longs les forces biologiques et donc plus le système s'écarte de l'équilibre thermodynamique. Par ailleurs, le milieu sondé par la bille est d'autant plus rigide que la densité de ligand est grande. Cela nous amène à poser la question du lien entre la valeur de l'écart à l'équilibre et les propriétés viscoélastiques du milieu et donc de l'efficacité de la transmission des forces biologiques par le milieu . En effet, plus un milieu est dissipatif, moins une force exercée localement sera transmise sur une grande distance. Les facteurs déterminant la force ressentie par la bille seraient à la fois le nombre de moteurs et la transmission de la déformation de l'actine corticale dans l'environnement de la bille.

Afin d'argumenter cette idée, nous pouvons reprendre le travail de Mizuno *et al.* [68] décrit précédemment (voir section 1.3.4). Leur expérience est très proche de la nôtre à la différence qu'ils travaillent sur des gels d'acto-myosine réticulés <sup>17</sup> *in vitro* rendus actifs par l'ajout d'ATP. Leur approche mathématique est aussi différente, au lieu de raisonner sur le déplacement quadratique moyen, ils calculent la fonction d'autocorrélation de la position de la sonde. En faisant une expérience de microrhéologie active, ils définissent la fonction de réponse  $\alpha_{eq}(\omega)$  de leur système telle que :

$$\alpha_{\rm eq}(\boldsymbol{\omega}) = \frac{u(\boldsymbol{\omega})}{F},\tag{3.16}$$

où *F* est la force extérieure exercée sur la sonde et *u* est le déplacement. En faisant une expérience de microrhéologie passive sur ces mêmes sondes, ils calculent la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation  $C(\omega)$  de la position des sondes :

$$C(\boldsymbol{\omega}) = \int \langle u(t)u(0) \rangle e^{i\boldsymbol{\omega} t} dt.$$
(3.17)

À l'équilibre, le théorème de fluctuation-dissipation donne une relation entre la partie imaginaire de la fonction de réponse  $\alpha_{eq}^{"}$  et la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation  $C_{eq}$  de la position de la sonde calculée en situation d'équilibre :

$$\alpha_{\rm eq}^{\prime\prime}(\omega) = \frac{\omega}{2k_B T} C_{\rm eq}(\omega). \tag{3.18}$$

Toujours en supposant que l'on puisse appliquer le théorème de fluctuation-dissipation <sup>18</sup>, la mesure de microrhéologie passive permet de calculer la grandeur  $\alpha''(\omega)$ :

$$\alpha''(\omega) = \frac{\omega}{2k_B T} C(\omega). \tag{3.19}$$

Si  $\alpha_{eq}^{"}$  et  $\alpha^{"}$  sont différentes, alors le système ne se trouve pas à l'équilibre thermodynamique. Nous pouvons définir, en procédant par analogie, une température effective, grandeur que l'on peut comparer à nos mesures :

$$\frac{\alpha''(\omega)}{\alpha''_{\rm eq}(\omega)} = \frac{C(\omega)}{C_{\rm eq}(\omega)} = \frac{T_{\rm eff}(\omega)}{T}.$$
(3.20)

<sup>17.</sup> La réticulation est effectuée avec des protéines biotines et neutravidines permettant de stabiliser le gel d'acto-myosine et retardant ainsi le phénomène de super-précipitation.

<sup>18.</sup> L'utilisation du théorème de fluctuation-dissipation pour définir une nouvelle fonction de réponse est ici peu appropriée : la notion supposée invariante entre un système à l'équilibre et le même système hors équilibre ne devrait pas être le théorème, mais la fonction de réponse.

La figure 3.19 haut représente les quantités  $\alpha_{eq}''(\omega)$  et  $\alpha''(\omega)$  mesurées sur le gel actif à différents instants de l'expérience. L'insert de cette figure montre  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}(\omega)$  et  $\alpha^{\prime\prime}(\omega)$  pour un gel dépourvu de myosine et le gel actif d'acto-myosine activé par l'ATP au début de l'expérience (t = 2.5 h). On voit que ces fonctions sont identiques, indiquant que le système est à l'équilibre. Dans le cas du gel dépourvu de myosine ce résultat est attendu, dans l'autre cas, bien que les auteurs ne donnent pas d'explication, on peut supposer qu'a t = 2.5 h le gel actif n'a pas eu le temps de s'organiser pour que les myosines exercent des forces sur l'ensemble du gel. Au bout de 5 h, cependant, une différence est mesurée entre  $\alpha_{eq}''(\omega)$  et  $\alpha''(\omega)$ , signature d'un système hors-équilibre. Les courbes vertes de la figure 3.19 haut sont les valeurs de  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}(\omega)$  et  $\alpha^{\prime\prime}(\omega)$  au bout de 6.8 h d'expérience. Le système est à l'équilibre au-delà de 10 Hz et s'en écarte en-dessous. Mizuno et al. interprètent cela par le fait qu'au-delà de cette fréquence de transition le système apparaît figé par rapport à la durée du cycle des myosines. Au bout de 9.3 h, une différence entre les  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}(\omega)$  et  $\alpha^{\prime\prime}(\omega)$  est toujours observée mais la fréquence de transition est plus grande. La différence provient de la fonction de réponse  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}(\omega)$  qui diminue avec le temps, ce qui signifie que leur sonde mesure un milieu plus rigide. En effet, l'ATP est transformé en ADP à mesure que les myosines effectuent leur cycle. Quand la quantité d'ATP diminue, le nombre de myosines attachées aux filaments d'actine augmente, ce qui rend le réseau plus réticulé et donc plus rigide. Une deuxième interprétation est que l'activité contractile des moteurs induit des contrainte de traction dans les filaments d'actine, ce qui le rend plus rigide. Cette dernière interprétation est celle privilégiée par Mizuno et al. Cependant, il est important de garder à l'esprit que la quantité d'ATP présent dans le réseau diminue au cours du temps. Il est intéressant de tracer la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(\omega)$  pour les mesures à ces deux temps et de la comparer aux fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  mesurées pour les différentes quantités de RGD dans notre expérience. La figure 3.19 bas présente les fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta$  pour les mesures de Mizuno *et al.* et pour les mesures des billes pour les densités RGD 1/10, RGD 1/20, RGD 1/40. De façon similaire, les écarts à l'équilibre pour toutes les courbes sont égaux à l'unité aux temps courts. Comme exposé précédemment dans notre expérience, le temps à partir duquel le système est mesuré hors de l'équilibre thermodynamique augmente quand la densité de ligand diminue<sup>19</sup>,

$$au_{1/10} \approx 0.2 \text{ s} < au_{1/20} \approx 0.7 \text{ s} < au_{1/40} \approx 2 \text{ s},$$

et à fréquence donnée, l'écart à l'équilibre est plus important pour des billes fortement attachées au cortex de la cellule. En même temps, le milieu entourant la sonde est d'autant plus rigide que la densité de ligand augmente. En traçant l'indice d'écart à l'équilibre pour les mesures de Mizuno *et al.*, le même comportement est observé : lorsque la quantité d'ATP diminue, les propriétés du milieu changent, le temps de transition semble diminuer et la valeur de l'écart à l'équilibre augmente. Pourtant dans le même temps, dans l'expérience de Mizuno *et al.*, la modification des propriétés viscoélatiques est accompagnée d'une diminution du nombre de myosines en capacité d'exercer des forces. Il s'agit d'un paradoxe :

<sup>19.</sup> La valeur de  $\tau_{1/10}$  fait l'hypothèse que le système arrive à l'équilibre aux hautes fréquences, fait non observé, expérimentalement non observable, mais vraisemblable.

la seule source d'activité hors-équilibre diminue alors que la mesure d'écart à l'équilibre augmente, c'est-à-dire que moins il y a de force stochastique menant le système hors de l'équilibre thermodynamique plus l'on observe un système éloigné de l'équilibre. À la lumière des mesures de Mizuno *et al.*, on comprend que les deux éléments importants sont d'une part le nombre de moteurs moléculaires exerçant des forces dans ce milieu et d'autre part les propriétés viscoélastiques du milieu propageant ces forces biologiques, en particulier les propriétés dissipatives du milieu. Malheureusement, Mizuno *et al.* ne donnent pas les grandeurs caractérisant la dissipation dans leur gel d'acto-myosine en fonction du temps de l'expérience. Il pourrait être instructif de faire une série d'expériences sur des gels actifs réticulés en faisant varier le nombre de réticulants. L'idée serait de changer la concentration des protéines biotines et neutravidines pour contrôler les propriétés viscoélastiques du gel sans changer l'activité des myosines. On pourrait alors étudier l'écart à l'équilibre en séparant la contribution de la dissipation dans le milieu et celle du nombre de myosines actives.

## 3.4 Conclusion

Les mesures de microrhéologie passive effectuées sur des sondes attachées au réseau d'actine par l'intermédiaire des intégrines révèlent deux comportements. Aux temps courts, les sondes ont un comportement sous-diffusif et aux temps longs un comportement surdiffusif. Ces mesures de microrhéologie passives combinées à des mesures de microrhéologie active nous donnent des informations sur la nature des forces s'exerçant sur la sonde. En effet, à l'aide du théorème fluctuation-dissipation, nous pouvons calculer à partir de la mesure de microrhéologie active le spectre des forces  $\hat{S}_{feq}(s)$  s'exerçant sur la sonde dans l'hypothèse où le système est à l'équilibre thermodynamique avec la même fonction de réponse. Dans le même temps, la combinaison des deux mesures de microrhéologie nous permet de calculer le spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  réellement exercées sur la bille. En comparant ces deux spectres nous avons mis en évidence deux comportement. Aux temps courts, le spectre des forces mesuré  $\hat{S}_f(s)$  et le spectre des forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  sont identiques, la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = 1$  indique que le système est à l'équilibre : les forces s'exerçant sur la sonde sont d'origine thermique. Aux temps longs, le spectre des forces  $\hat{S}_f(s)$  mesuré s'écarte du spectre des forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ , la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  est supérieure à 1, le système s'écarte de l'équilibre thermodynamique, les forces s'exerçant sur la sonde et menant le système hors de l'équilibre sont d'origine biologique.

La densité de ligand a un effet manifeste sur les différentes mesures de microrhéologie active et passive. Plus la concentration en RGD est grande, moins le milieu sondé par la bille est déformable. De plus, plus la quantité de ligand augmente, plus l'amplitude des fluctuations de la sonde aux temps courts est faible et plus le mouvement de la sonde est dirigé aux temps longs. Le résultat intéressant est, alors que l'on observe un système à l'équilibre aux temps courts, l'augmentation de la concentration de ligand autour des sondes a un effet sur l'activité hors-équilibre. La valeur du spectre des forces mesuré et l'écart à l'équilibre augmentent avec la concentration de ligand recouvrant la sonde. De



**FIGURE 3.19** – En haut : fonctions de réponse  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}$  et  $\alpha^{\prime\prime}$  (équations 3.18 et 3.19) de bille dans des gels d'acto-myosines activés par de l'ATP extraites de l'expérience de Mizuno *et al* [68] à des temps t = 6.8 h (courbes vertes) et t = 9.3 h (courbes oranges) après le début de l'expérience. Dans l'insert, les courbes  $\alpha_{eq}^{\prime\prime}$  et  $\alpha^{\prime\prime}$  pour des gels sans myosines (courbe jaune) et des gels actifs non organisés (t = 2.5 h, courbe violette). Les courbes verte, jaune et violette sont dans leur format original sur la figure 1.19. En bas : même chose que la figure 3.17 droite à laquelle est ajouté l'indice d'écart à l'équilibre  $\theta(\omega)$  issue des expériences de Mizuno *et al* pour t = 6.8 h (courbes vertes) et t = 9.3 h (courbes oranges). Courbe adaptée de [68] à l'aide du logiciel PlotDigitizer (www.plotdigitizer.sourceforge.net). L'interprétation de ces courbes est dans le texte de la section 3.3.6.

plus, le temps à partir duquel le système s'écarte de l'équilibre diminue lorsque la densité de ligand augmente. Aux temps longs, la fonction d'autocorrélation des forces peut être calculée en supposant que le spectre des forces se comporte comme une loi de puissance. L'amplitude de la fonction d'autocorrélation des forces s'exerçant sur la sonde et l'exposant de la loi de puissance augmentent à mesure que la concentration en RGD augmente. Une première interprétation, basée sur le modèle de Robert *et al.*, serait qu'une bille ayant plus de liens avec le cortex subit le travail de plus de moteurs travaillant simultanément et dans le même sens. Cependant, le nombre de moteurs ne serait peut-être pas le seul facteur déterminant l'écart du système à l'équilibre. En effet un nombre de moteurs constant (et même diminuant) peut mener le système davantage hors de l'équilibre si le milieu est moins dissipatif.

Il faut garder à l'esprit que tout au long de ce chapitre nous avons fait des hypothèses sur la nature exacte des forces stochastiques menant le système hors de l'équilibre. Nous avons proposé deux acteurs biologiques : les moteurs moléculaires, principalement les myosines II et la polymérisation de l'actine. Ces hypothèses doivent être vérifiées expérimentalement en inhibant les processus biologiques à l'aide de drogues. Enfin, au vu des résultats de l'article de Mizuno *et al.* il sera intéressant de regarder l'effet sur nos mesures de la variation de la quantité d'ATP dans les cellules.

# CHAPITRE 4

# Modification du métabolisme cellulaire

# Sommaire

4.1	Introduction		
4.2	Effets de la température		
	4.2.1	Résultats expérimentaux92	
	4.2.2	Discussion	
4.3	Recherche des acteurs biologiques		
	4.3.1	Drogues agissant sur le cytosquelette	
	4.3.2	Effet des drogues sur les mesures de microrhéologie à tempéra- ture ambiante99	
	4.3.3	Effet des drogues sur les mesures de microrhéologie à tempéra- ture physiologique	
	4.3.4	<b>Discussion</b>	
4.4	Mesures de microrhéologie sur une même cellule avant et après traitement pharmacologique		
	4.4.1	Résultats expérimentaux 117	
	4.4.2	<b>Discussion</b>	
4.5	Conc	Conclusion	

# 4.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les expériences que nous avons entreprises pour faire varier l'activité biologique des cellules. L'une de ces techniques consiste à faire varier la température de l'enceinte expérimentale, une autre à inhiber certains processus biologiques soit en appauvrissant la quantité d'ATP dans les myoblastes soit en interrompant la polymérisation de l'actine soit encore en inhibant l'activité des moteurs moléculaires myosines.

### 4.2 Effets de la température

Dans une première partie, nous allons décrire les résultats des mesures de microrhéologie passive et active sur des billes recouvertes d'une concentration RGD 1/20 pour des cellules à température physiologique. Nous allons ensuite comparer ces mesures à celles effectuées à température ambiante ( $\sim 25^{\circ}$ C) pour la même concentration de ligand. Tout au long de l'étude sur les effets de la température, la couleur **bleue** représentera la température ambiante ( $\sim 25^{\circ}$ C) et la couleur **rouge** la température physiologique (37°C).

#### 4.2.1 Résultats expérimentaux

#### Microrhéologie active et passive

La figure 4.1A représente les moyennes géométriques des fonctions de réponse  $\hat{J}(s)$  pour la température ambiante (~ 25°C) en bleu et pour 37°C en rouge. Le nombre de mesures *N* pour chaque moyenne est :  $N_{25^{\circ}C} = 39$  et  $N_{37^{\circ}C} = 124$ . L'amplitude *B* et l'exposant  $\beta$  de  $\hat{J}(s)$  dépendent de la température :

$$\overline{J_0}^{37^{\circ}\mathrm{C}} = 7.9 \pm 1.2 \text{ nm/pN} > \overline{J_0}^{25^{\circ}\mathrm{C}} = 4.2 \pm 0.8 \text{ nm/pN},$$

$$\overline{\beta}_{37^{\circ}C} = 0.29 \pm 0.02 > \overline{\beta}_{25^{\circ}C} = 0.19 \pm 0.02.$$

Cette dépendance à la température signifie qu'à température physiologique, le milieu sondé est à la fois plus déformable <sup>1</sup> et plus dissipatif <sup>2</sup> qu'à température ambiante. La figure 4.1B est la moyenne des déplacements quadratiques moyens  $\Delta x^2(\tau)$  pour les mêmes données que la figure 4.1A et dans la même direction d'application de la force. Les déplacements quadratiques moyens présentent deux régimes, sous-diffusif puis sur-diffusif, quelle que soit la température. Cependant, l'amplitude de  $\Delta x^2(\tau)$  à 37°C est supérieure à celle à 25°C pour toutes les échelles de temps. Une étude plus précise des déplacements quadratiques

<sup>1.</sup> Les valeurs  $\overline{J_0^{37^{\circ}C}}$  et  $\overline{J_0^{25^{\circ}C}}$  montrent qu'à force donnée, la bille se déplace plus à température physiologique qu'à température ambiante, et donc que le milieu attaché à celle-ci se déforme plus.

<sup>2.</sup> Il est important de rappeler que si l'exposant  $\beta \to 0$  alors le milieu tend vers un comportement élastique, et si  $\beta \to 1$  alors le milieu tend vers un comportement visqueux.

moyens  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  avec une méthode similaire à la partie 3.3.3 a été effectuée. Les résultats, pour les préfacteurs  $A_1$  et  $A_2$  et les exposants  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  pour respectivement le régime sous-diffusif et sur-diffusif, sont pour un nombre de mesure  $N_{25^{\circ}C} = 77$  et  $N_{37^{\circ}C} = 156$ :

$$\overline{A_1}^{37^{\circ}C} = 238 \pm 22 \text{ nm}^2 > \overline{A_1}^{25^{\circ}C} = 78 \pm 10 \text{ nm}^2,$$
  
$$\overline{\alpha_1}^{37^{\circ}C} = 0.44 \pm 0.01 > \overline{\alpha_1}^{25^{\circ}C} = 0.24 \pm 0.01,$$
  
$$\overline{A_2}^{37^{\circ}C} = 188 \pm 19 \text{ nm}^2 > \overline{A_2}^{25^{\circ}C} = 52 \pm 10 \text{ nm}^2,$$
  
$$\overline{\alpha_2}^{37^{\circ}C} = 1.44 \pm 0.02 > \overline{\alpha_2}^{25^{\circ}C} = 1.38 \pm 0.05.$$

Le préfacteur  $A_1$  et l'exposant  $\alpha_1$  sont plus grands à 37°C. En supposant que le système est à l'équilibre thermodynamique dans le régime sous-diffusif, ceci corrobore l'idée que le milieu est plus déformable et plus dissipatif à température physiologique. L'exposant  $\alpha_2$ du régime sur-diffusif est légèrement supérieur à 37°C à celui à température ambiante, ceci signifie que le mouvement moyen des sondes est davantage dirigé à température physiologique. Cette dépendance de l'exposant  $\alpha_2$  a aussi été observée par Bursac *et al.* [14]. À partir de nos résultats, le temps de transition  $\tau^*$ , temps à partir duquel le déplacement quadratique moyen passe d'un régime sous-diffusif à sur-diffusif, peut être calculé. Celui-ci est légèrement supérieur à température ambiante :

$$\overline{\tau}_{37^{\circ}C} = 1.3 \pm 0.1 \text{ s} < \overline{\tau}_{25^{\circ}C} = 1.7 \pm 0.2 \text{ s}.$$

#### Spectre de forces et écart à l'équilibre

En combinant chaque mesure de microrhéologie passive et active, nous pouvons calculer le spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$ . La mesure de microrhéologie active nous offre la possibilité *via* le théorème de fluctuation-dissipation de calculer le spectre de forces  $\hat{S}_{feq}(s)$  dans le cas où le système sondé serait à l'équilibre. La figure 4.1C représente la moyenne du spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé) en fonction de la fréquence pour les deux températures étudiées. La figure 4.1D trace la moyenne de la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s) / \hat{S}_{feq}(s)$  en fonction de la fréquence s. Les spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$ et  $\hat{S}_{feq}(s)$  se rejoignent aux temps courts quelle que soit la température, ce qui se traduit par une valeur de  $\theta(s) = 1$  aux temps courts. Nous obtenons le même résultat que dans la partie précédente, c'est-à-dire que le système est à l'équilibre thermodynamique aux temps courts. Pour les temps longs, les spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  s'écartent du spectre à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ . Il semble que le spectre de forces à 37°C s'écarte plus rapidement de l'équilibre que celui à 25°C. Sur la figure 4.1D, la fonction d'écart à l'équilibre à 37°C est significativement au-dessus de celle à 25°C aux temps longs. Ceci permet de voir que le système s'écarte davantage de l'équilibre thermodynamique et à un temps caractéristique plus court à température physiologique. Donc l'amplitude des forces biologiques agissant sur la sonde dépasse l'amplitude des forces thermiques à température physiologique pour des temps plus courts. La fonction de corrélation des forces aux temps longs est extraite par un ajustement du spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  avec une loi de puissance :  $\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t = c(\tau/\tau_0)^{\gamma}$ . Pour  $\tau_0 = 1$  s on obtient :

$$c_{37^{\circ}\mathrm{C}} \approx 1.2 \mathrm{ pN}^2 \approx c_{25^{\circ}\mathrm{C}} \approx 1.5 \mathrm{ pN}^2,$$

$$\gamma_{37^{\circ}C} \approx 0.8 > \gamma_{25^{\circ}C} \approx 0.5$$

Les valeurs de *c* sont sensiblement proches pour les deux températures, cependant les exposants augmentent avec la température.

#### 4.2.2 Discussion

#### La rhéologie cellulaire et la température

Des mesures de microrhéologie active avec des micro-billes magnétiques ont montré une dépendance similaire à la température : à mesure que celle-ci augmentait, le milieu cellulaire devenait plus déformable [111, 94] et plus dissipatif [14]. Les mécanismes qui gouvernent la rhéologie du cytosquelette sont de différentes natures [97]. Le cytosquelette peut être vu comme un matériau vitreux mou tel une mousse, une émulsion ou un milieu granulaire [90, 89]. Les éléments de ce type de matériau sont piégés dans des puits d'une hauteur supérieure à  $k_BT$  et un apport d'énergie extérieur permet aux constituants du matériau de changer d'état. Dans ce modèle de matériau vitreux mou, le cytosquelette est comparable à un réseau de polymères réticulés [47] et le changement d'état à un réarrangement local dû aux décrochages et aux réaccrochages (voir section 1.1.4) ou aux dépliements de protéines réticulantes. La cinétique de ces réactions de réarrangement est activée thermiquement [47]. On comprend donc qu'une élévation de température favorise ces réarrangements ce qui donnera un milieu plus déformable. Au contraire, Sunyer et al. [97], en mesurant le prestress de cellules épithéliales par microscopie de traction, ont observé que l'élévation de la température augmentait la contractilité cellulaire. Leurs résultats sont corrélés à des mesures de microrhéologie par AFM et, de façon intéressante, ils sont totalement contraires aux nôtres. Leurs mesures à température physiologique décrivent à la fois un milieu plus rigide et moins dissipatif qu'à 13°C. Sunyer et al. interprètent cette différence par une variation drastique du contact chimique entre la sonde et le cortex quand la température change alors que pour les mesures d'AFM aucune liaison chimique n'existe entre la sonde et la cellule pour faire la mesure de microrhéologie. Une autre interprétation possible est liée au fait que la bille utilisée pour les mesures d'AFM est trois fois plus grande que la nôtre. Ils mesurent donc la rhéologie du cortex sur une plus grande distance ce qui permet à leurs sondes d'être éventuellement plus sensibles aux fibres de stress. Sunyer et al. voient d'ailleurs qu'en inhibant les myosines II, moteurs impliqués dans les fibres de stress, la rhéologie de la cellule ne dépend plus de la température. Ils interprètent alors l'augmentation de la rigidité en fonction de la température comme une activation de



**FIGURE 4.1** – En A : moyennes géométriques de la transformée de Laplace de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  en fonction de la fréquence à température ambiante (bleu) et à température physiologique (rouge). En B : moyennes géométriques du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$ . En C : moyennes géométriques des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et des spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé). En D : moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s)/\hat{S}_{feq}(s)$ . Le nombre de mesures N utilisé pour le calcul des moyennes est : N = 39 pour les mesures à 25°C et N = 124 pour les mesures à 37°C. La couleur bleue correspond aux mesures à température ambiante et la couleur rouge aux mesures à température physiologique. Les traits pointillés fins correspondent aux erreurs standards.

la machinerie d'acto-myosine et une augmentation de la force moyenne exercée par chaque myosine ou une augmentation du nombre moyen de myosines travaillant par fibre.

#### Spectre de forces, écart à l'équilibre et température

Les différents processus biologiques menant le système hors de l'équilibre sont des réactions chimiques activées par l'énergie thermique et utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Dans un second article [96], Sunyer *et al.* utilisent la loi d'Arrhenius pour interpréter ces réactions activées par l'énergie thermique. Cette loi décrit la variation de la vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température, telle que le taux de réaction  $v \sim \exp(-E_0/k_BT)$  où  $E_0$  est l'énergie d'activation de la réaction et *T* la température. Sunyer *et al.* définissent le taux de réaction comme l'inverse du temps nécessaire à une bille attachée au cytosquelette *via* la RGD pour parcourir 1000 nm<sup>2</sup>. Ce seuil n'est pas important tant qu'il correspond à un temps situé dans le régime sur-diffusif où le système est hors-équilibre. En faisant des expériences à différentes températures, ils peuvent extraire une énergie d'activation  $E_0 = 40k_BT_a$  où  $T_a$  est la température ambiante. À partir des données de microrhéologie passive nous pouvons calculer l'énergie d'activation. Nous trouvons  $E_0 \approx 30k_BT_a$  soit un résultat similaire à celui de Sunyer *et al.* 

La combinaison des deux méthodes de microrhéologie nous permet de montrer que la fonction de corrélation de la force varie en fonction de la température, notamment sa dépendance fréquentielle. En effet, la pente  $\gamma_{37^{\circ}C}$  est plus grande que  $\gamma_{25^{\circ}C}$  ce qui signifie, d'après le modèle de Robert *et al.*, une augmentation du nombre de moteurs moléculaires travaillant simultanément et de façon coordonnée. Cela va avec l'idée de Sunyer *et al.* que l'élévation de température peut augmenter le nombre de myosines par fibre de stress. Par la mesure de l'écart à l'équilibre, on voit que le système est davantage hors-équilibre à température physiologique. Le rapport entre les forces d'origine biologique menant le système hors de l'équilibre et les forces thermiques est plus grand à 37°C qu'à température ambiante. En réutilisant le modèle de la cage présenté dans la partie précédente, nous pouvons extraire des mesures de microrhéologie passive une vitesse de cage. Curieusement, alors que celle-ci ne dépendait presque pas de la quantité de RGD, l'augmentation de la température multiplie par un facteur deux la vitesse de la cage :  $v_{25^{\circ}C} \approx 6$  nm/s <  $v_{37^{\circ}C} \approx 13$  nm/s.

#### Conclusion

En augmentant la température, nous avons réussi à influencer des paramètres biologiques et nous avons mesuré une augmentation de l'activité biochimique. Nous avons supposé que les réactions chimiques étaient ATP-dépendantes et que les protéines responsables des forces stochastiques athermiques étaient des moteurs moléculaires tels que les myosines II. Mais pour l'instant tout ceci n'est qu'hypothèse, la partie suivante va tenter d'identifier les vrais acteurs et de définir le rôle de chacun. Nous avons ciblé trois éléments importants du cortex cellulaire et nous allons agir sur eux à l'aide de traitements pharmacologiques :

- l'ATP, source d'énergie principale menant le cortex hors de l'équilibre ;

- les filaments d'actines auxquels la bille est reliée créant la structure du cortex ;
- les myosines II, connues pour exercer des forces sur les filaments d'actine.

# 4.3 Recherche des acteurs biologiques

Identifier les composants biologiques responsables des forces non-thermiques est une entreprise difficile. En effet, le seul moyen d'identifier un élément du cytosquelette comme responsable de l'activité hors-équilibre mesurée est de l'inactiver à l'aide de toxines (ou drogues). Ensuite, il est nécessaire de refaire les mesures de microrhéologie passive puis active sur les cellules droguées afin de les comparer aux mesures sur des cellules saines. À ce stade, il est important de noter que les effets d'une drogue peuvent être multiples sur des organismes aussi complexes que les cellules vivantes. Les résultats des mesures de microrhéologie passive et active présentés dans cette partie peuvent être sujets à plusieurs interprétations.

Afin d'examiner complètement les effets des drogues, nous avons entrepris une étude exhaustive du système bille-cellule, en observant la dépendance des mesures de microrhéologie active et passive aux drogues utilisées pour les trois quantités de ligand étudiées précédemment (RGD 1/40, RGD 1/20, RGD 1/10).

#### 4.3.1 Drogues agissant sur le cytosquelette

Afin d'inhiber certains processus biologiques, nous utilisons des drogues connues pour agir sur les différents composants du cytosquelette. Nous avons sélectionné trois acteurs importants responsables du comportement hors-équilibre mesuré sur le système bille-cortex.

#### La déplétion de l'ATP

Tout d'abord, il y a l'ATP qui est le carburant de la cellule, nécessaire à la production de la plupart des protéines et à leur activité. Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'ATP était impliqué dans la (dé)polymérisation de l'actine (figure 1.4) et dans le cycle de fonctionnement des moteurs moléculaires (figure 1.9). Il est possible d'appauvrir la quantité d'ATP de la cellule avec une solution de deoxyglucose et de NaN<sub>3</sub> (voir protocole B.2.1). Ces deux éléments chimiques diminuent la quantité d'ATP dans les cellules par deux mécanismes différents. L'azide de sodium inhibe une enzyme (cytochrome c oxidase) dans le cycle de respiration cellulaire ce qui empêche la transformation d'ADP en ATP dans la cellule. La phosphorylation du deoxyglucose induite par une enzyme (hexokinase) est une réaction qui consomme de l'ATP [34]. La réaction du deoxyglucose va donc consommer les molécules d'ATP libres dans la cellule et les transformer en ADP. Il est à noter que les myoblastes peuvent, en-dehors des processus aérobies, produire de l'ATP par des mécanismes anaérobies utilisant par exemple le glucose du milieu cellulaire. C'est pourquoi il est nécessaire de stopper à la fois l'aérobie avec du NaN<sub>3</sub> et de forcer la consommation d'ATP par le deoxyglucose.

#### La dépolymérisation des filaments d'actine

Ensuite, il y a les filaments d'actines sur lesquels est attachée la sonde par l'intermédiaire des intégrines et de différentes protéines. Il est possible d'interrompre la polymérisation de l'actine en utilisant de la latrunculine A. Cette molécule a la capacité de s'attacher aux monomères d'actine globulaire empêchant ainsi les monomères de polymériser. La polymérisation de l'actine étant un processus dynamique, au bout d'un certain temps, normalement, la quantité d'actine sous forme de filaments doit diminuer (voir protocole B.2.2). L'effet de la latrunculine A est remarquable visuellement comme en témoigne la figure 4.2 où l'on voit une diminution apparente de la tension de la cellule.



**FIGURE 4.2** – À gauche, photo d'une cellule C2C12. À droite, même cellule après traitement à la latrunculine A. La cellule semble être moins sous tension après le traitement à la latrunculine A.

#### L'inhibition des myosines II

Nous avons aussi essayé d'inhiber l'activité des myosines II en utilisant de la blebbistatine (voir protocole B.2.3). Effectivement, il a été montré que la blebbistatine agissait spécifiquement sur la myosine II [53]. La molécule de blebbistatine, au cours du cycle des myosines (figure 1.9), va se lier aux complexes myosine-ADP-Pi et interférer avec la réaction de libération du phosphate (figure 4.3C). Le cycle normal permettant aux myosines d'exercer des forces est alors impossible et la myosine est bloquée dans un état détaché. Nous utilisons une forte concentration de blebbistatine (50  $\mu$ M) afin d'inhiber quasiment 100% des myosines dans les myoblastes [53].

#### L'effet du 2,3-Butanedione monoxime (BDM)

Enfin, nous avons choisi de faire des mesures à 37°C en utilisant du 2,3-Butanedione monoxime (BDM) (voir protocole B.2.4). Dans un premier temps, nous pensions que cette molécule était un inhibiteur général des moteurs moléculaires ATPase (principalement la famille des myosines). Seulement, après la lecture du travail d'Ostap [72] sur cette drogue nous avons compris que ses effets sur le métabolisme cellulaire n'étaient pas triviaux. Cette drogue est un inhibiteur des myosines II mais n'a pas l'air d'agir sur d'autres types de

myosines et n'affecte pas la polymérisation de l'actine [3]. De plus, il a été trouvé que le BDM affectait divers processus biologiques dans la cellule (la phosphorylation de certaines protéines, les canaux calciques [93, 86, 37]). Cependant, un article plus récent intitulé *Does 2,3-butanedione monoxime inhibit nonmuscle myosin ?* [35] conclut à l'appui de plusieurs exemples <sup>3</sup> que le BDM a un effet sur des phénomènes de motilité dus aux myosines. Pour conclure, le BDM semble avoir un effet sur les moteurs de la famille des myosines mais les mécanismes par lesquels il agit restent incertains à ce jour.



**FIGURE 4.3** – Retour sur la figure 1.9 présentant le cycle des myosines. Le cycle est maintenant altéré avec de la blebbistatine empêchant la libération du phosphate dans le complexe ADPphosphate. La myosine ne peut plus s'attacher au filament d'actine et la génération de force est impossible. Inspiré de [53].

Pour une meilleure lisibilité, un code couleur a été établi dans la partie suivante. Les mesures sur des **cellules de contrôle** seront représentées sur les graphes en **bleu**, les mesures sur des **cellules appauvries en ATP (déplétion de l'ATP)** seront représentées par la couleur **noire**, les mesures sur des cellules droguées à la **latrunculine (dépolymérisation de l'actine)** seront représentées par la couleur **verte** et les cellules droguées avec de la **blebbistatine (inhibition des myosines II)** seront représentées par la couleur **rouge**.

#### 4.3.2 Effet des drogues sur les mesures de microrhéologie à température ambiante

#### Organisation des données, courbes, histogrammes

L'effet des drogues sur les déplacements quadratiques moyens  $\Delta R^2(\tau) = \Delta x^2(\tau) + \Delta y^2(\tau)$  est calculé en utilisant une méthode identique à celle de la partie 3.3.3. Nous pouvons extraire les valeurs du préfacteur  $A_1$  et de l'exposant  $\alpha_1$  issues de l'ajustement de la partie sous-diffusive du déplacement quadratique moyen :  $\Delta R^2(\tau) = A_1(\tau/\tau_0)^{\alpha_1}$  ainsi que

<sup>3.</sup> Ils comparent les effets du BDM avec ceux d'autres drogues notamment des inhibiteurs spécifiques de myosines.

le préfacteur  $A_2$  et de l'exposant  $\alpha_2$  issus d'un ajustement du même type dans la partie sur-diffusive du déplacement quadratique moyen :  $\Delta R^2(\tau) = A_2(\tau/\tau_0)^{\alpha_2}$ . Les valeurs de  $A_1$  et  $A_2$  sont calculées pour  $\tau_0 = 1$  s ce qui nous permet de les exprimer en nm<sup>2</sup>. Toutes les moyennes et les erreurs standards de ces valeurs ainsi que le nombre de mesures sont notés :

- dans la table 4.1 pour les mesures effectuées sur des billes avec une concentration de ligand RGD 1/40 à température ambiante;
- dans la table 4.2 pour une concentration de ligand RGD 1/20 à température ambiante;
- dans la table 4.3 pour une concentration de ligand RGD 1/10 à température ambiante.

L'effet des drogues sur les mesures de microrhéologie active est quantifié en ajustant la fonction  $\hat{J}(s)$  par une loi de puissance (voir partie 3.3.4). Les fonctions  $\hat{J}(s)$  sont tracées pour les mesures à des concentrations RGD 1/40 et RGD 1/20 sur respectivement la figure 4.5A et la figure 4.6A. Nous pouvons en déduire la forme de la fonction de réponse dans l'espace temporel  $J(\tau) = J_0(\tau/\tau_0)^{\beta}$ . Les valeurs de  $J_0$  sont calculées pour  $\tau_0 = 1$  s ce qui permet de les exprimer en nm/pN. Les moyennes et les erreurs standards de  $J_0$  et  $\beta$  en fonction des drogues sont notées :

- dans la table 4.4 pour les mesures effectuées sur des billes avec une concentration de ligand RGD 1/40 à température ambiante;
- dans la table 4.5 pour une concentration de ligand RGD 1/20 à température ambiante;
- dans la table 4.6 pour une concentration de ligand RGD 1/10 à température ambiante.

De plus, afin de visualiser globalement les effets des drogues à température ambiante en fonction de la concentration en RGD, toutes les données des tables précédentes sont mises sous forme d'histogramme :

- l'histogramme 4.4A représente les valeurs du préfacteur  $A_1$ ;
- l'histogramme 4.4C représente les valeurs de l'exposant  $\alpha_1$ ;
- l'histogramme 4.4B représente les valeurs du préfacteur  $A_2$ ;
- l'histogramme 4.4D représente les valeurs de l'exposant  $\alpha_2$ ;
- l'histogramme 4.4E représente les valeurs du préfacteur  $J_0$ ;
- l'histogramme 4.4F représente les valeurs de l'exposant  $\beta$ .

Les moyennes géométriques des déplacements quadratiques moyens  $\Delta R^2(\tau)$  n'ont pas été tracées afin d'alléger le nombre de figures. Cependant le lecteur pourra toujours se référer aux déplacements quadratiques moyens  $\Delta x^2$  dans une direction qui est la même que la direction d'application de la force lors de la mesure active. Les  $\Delta x^2(\tau)$  et les  $\Delta R^2(\tau)$ ont la même allure et la même dépendance<sup>4</sup>, leurs amplitudes diffèrent en moyenne d'un facteur deux. Les courbes  $\Delta x^2(\tau)$  en fonction des drogues sont tracées la sur figure 4.5B et la figure 4.6B pour respectivement une concentration RGD 1/40 et RGD 1/20.

<sup>4.</sup> Elle sont issues des mêmes mesures. Cependant le nombre de mesures de  $\Delta R^2(\tau)$  est toujours supérieur à celui de  $\Delta x^2(\tau)$ , car pour  $\Delta x^2(\tau)$  nous n'avons gardé que les mesures correspondantes aux billes utilisées pour les mesures de microrhéologie active, c'est d'ailleurs pour cela que la moyenne de  $\Delta x^2(\tau)$  est toujours tracée à côté des moyennes des fonctions de réponse.

#### Résultat de la microrhéologie passive à température ambiante

Pour des concentrations RGD 1/40, l'inhibition des myosines II avec de la blebbistatine ainsi que la dépolymérisation de l'actine avec de la latrunculine augmentent la valeur du préfacteur  $A_1$  par rapport à celle des cellules de contrôle. Cependant cela n'est pas significatif sur les mesures de la latrunculine. Au contraire, le préfacteur  $A_1$  diminue lors de la déplétion de l'ATP. Les valeurs de l'exposant  $\alpha_1$  ne varient pas beaucoup, mais l'exposant de la partie sous-diffusive des cellules traitées à la latrunculine ( $\alpha_1 = 0.27$ ) est significativement plus bas par rapport au contrôle. Les exposants  $\alpha_2$  ont tous une valeur autour de la valeur de contrôle ( $\alpha_2 \approx 1.18$ ) sauf pour les cellules traitées avec de la blebbistatine qui ont une valeur de l'exposant ( $\alpha_2^{blebb} \approx 1.38$ ) qui augmentent par rapport aux cellules saines.

Pour des concentrations RGD 1/20, seule la dépolymérisation de l'actine a un effet significatif sur le préfacteur  $A_1$ , il passe de 77 nm<sup>2</sup> pour les cellules de contrôle à 308 nm<sup>2</sup> pour la latrunculine. L'exposant  $\alpha_1$  est plus grand pour les cellules appauvries en ATP et traitées à la latrunculine. L'exposant  $\alpha_2$  de la partie sur-diffusive pour des cellules traitées avec de la latrunculine chute, passant de  $\alpha_2 \approx 1.38$  pour le contrôle à  $\alpha_2 \approx 1.23$ .

Pour des concentrations RGD 1/10, les grandeurs intéressantes ne semblent pas dépendre des drogues, à part peut-être la valeur de l'exposant sur-diffusif pour des cellules droguées à la blebbistatine chutant de  $\alpha_2 = 1.6$  pour les expériences de contrôle à 1.42.

À la lumière de ces résultats, il est difficile d'interpréter l'effet des drogues qui dépend de la quantité de ligand. Les drogues ne semblent pas altérer le mouvement spontané des sondes attachées avec une concentration RGD 1/10 même si l'inhibition de myosines diminue  $\alpha_2$  et donc la directivité du mouvement dans le régime sur-diffusif. En regardant les moyennes géométriques des déplacements quadratiques moyens pour RGD 1/40 (figure 4.5B) et RGD 1/20 (figure 4.6B), nous observons une hiérarchie de leurs amplitudes. Tout d'abord, comme pour Bursac et al. [14], les courbes des déplacements quadratiques moyens pour les cellules appauvries en ATP se trouvent toujours en-dessous des courbes de contrôle, le manque d'ATP diminue donc l'amplitude des fluctuations. Mais au vu des exposants de la partie sur-diffusive, il ne diminue pas la directivité du mouvement. L'amplitude des déplacements quadratiques moyens sur les cellules droguées à la latrunculine est au-dessus. Ceci se comprend quand on remarque que l'actine est dépolymérisée et la sonde est plus libre de se mouvoir. La directivité du mouvement pour des billes sur des cellules droguées à la latrunculine chute pour la concentration RGD 1/20. L'effet de la blebbistatine est très surprenant, l'amplitude des fluctuations augmente dans les deux régimes. Aux temps courts cela peut se comprendre car les myosines sont détachées de l'actine, et donc le milieu est peut-être moins rigide, mais les mesures de microrhéologie active présentées ci-après semblent contredire cette hypothèse. La directivité du mouvement dans la partie sur-diffusive est insensible à la quantité de RGD avec un exposant  $\alpha_2^{\text{blebb}} \approx 1.4$ . Ceci est curieux car toutes les autres mesures de  $\alpha_2$  augmentent en même temps que la concentration en ligand.


**FIGURE 4.4** – Histogrammes représentant les valeurs de  $A_1$  (en A),  $A_2$  (en B),  $\alpha_1$  (en C),  $\alpha_2$  (en D),  $J_0$  (en E) et  $\beta$  (en F) pour différentes concentrations de RGD (RGD 1/40, RGD 1/20, RGD 1/40) et pour différents traitements pharmacologiques : blebbistatine (inhibition des myosines II) en rouge, latrunculine (dépolymérisation de l'actine) en vert, deoxyglucose et NaN<sub>3</sub> (déplétion de l'ATP) en noir et les mesures de contrôle sont en bleu. Les valeurs  $A_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $A_2$ ,  $\alpha_2$  correspondent respectivement aux exposants et préfacteurs de la partie sous-diffusive et la partie sur-diffusive du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau)$ . Les valeurs  $J_0$  et  $\beta$  correspondent au préfacteur et à l'exposant de la fonction de réponse  $J(\tau)$ . Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards. Les valeurs de ces histogrammes sont écrites dans les tables 4.1 et 4.4 pour la concentration RGD 1/40, les tables 4.2 et 4.5 pour la concentration RGD 1/20 et les tables 4.3 et 4.6 pour la concentration RGD 1/10.

### Résultat de la microrhéologie active à température ambiante

Pour les mesures de microrhéologie active des tendances semblent apparaître pour des concentrations RGD 1/40 et RGD 1/20. La blebbistatine n'a aucun effet sur le préfacteur  $J_0$  ni l'exposant  $\beta$ . Lors de la déplétion de l'ATP, le préfacteur  $J_0$  semble chuter par rapport aux expériences de contrôle, le milieu devient alors moins déformable. La dépolymérisation de l'actine a l'effet inverse et augmente la valeur du préfacteur et le milieu devient plus déformable. Néanmoins ces effets ne sont significatifs qu'à des concentrations en ligand RGD 1/20 passant de 4.2 nm/pN pour les cellules de contrôle à 9.9 nm/pN pour la latrunculine et à 1.9 nm/pN pour les expériences de déplétion de l'ATP. Pour la concentration RGD 1/10, les valeurs de  $J_0$  ne dépendent pas des drogues administrées aux cellules.

L'exposant  $\beta$  ne varie pas entre les cellules de contrôle et les cellules droguées à la blebbistatine et à la latrunculine. Pour la déplétion de l'ATP, l'effet est inattendu : alors que pour la concentration RGD 1/40 il n'y a aucun effet, à la concentration RGD 1/20 l'exposant  $\beta$  diminue par rapport au contrôle, passant de  $\beta_{\text{control}}^{1/20} = 0.2$  à  $\beta_{\text{ATP}}^{1/20} = 0.14$ . À la concentration RGD 1/10 celui-ci augmente passant de  $\beta_{\text{control}}^{1/10} = 0.2$  à  $\beta_{\text{ATP}}^{1/10} = 0.29$ . Cela veut dire qu'à RGD 1/20, la déplétion de l'ATP rapproche le milieu d'un comportement élastique alors qu'à RGD 1/10 le contraire se produit.

L'inhibition des myosines II est sans effet sur la mesure de la fonction de réponse. Ceci est étonnant, au vu du mécanisme d'action de la blebbistatine qui inhibe les myosines II en les maintenant détachées. Ce résultat est en contradiction avec Balland *et al.* [8] qui observaient après ajout de blebbistatine une diminution de la rigidité et de la dissipation dans le cortex. Leur résultat paraît pourtant cohérent avec l'effet de la blebbistatine qui diminue le nombre de myosines en position attachée et par conséquent le nombre de réticulants dans l'actine corticale.

La latrunculine A inhibant la polymérisation de l'actine rend le milieu sondé plus déformable. L'effet de la dépolymérisation aura tendance à détruire en partie les filaments d'actine sur lesquels la bille est attachée. Ce résultat a été observé dans plusieurs articles [29, 56, 59, 79] par des mesures de microrhéologie par magnétocytométrie où une augmentation de l'exposant  $\beta$  est aussi mesurée par rapport aux contrôles. Ce fait, que nous n'observons pas, signifie que la diminution du nombre de filaments d'actine augmente la partie dissipative du milieu.

La déplétion de l'ATP dans les cellules rigidifie le milieu cellulaire pour des concentrations en ligand RGD 1/20 et RGD 1/40. Nous pouvons interpréter cela en nous basant sur le cycle des myosines II. Assurément, l'absence d'ATP aura pour effet d'attacher les myosines au cytosquelette. Cet ajout de réticulant au cortex d'actine va le rendre plus rigide. Seulement, au vu de l'effet de la blebbistatine sur nos mesures de microrhéologie active, les myosines II ne semblent pas participer à la rhéologie du cortex. L'autre piste à explorer est peut-être l'influence de la déplétion de l'ATP sur la polymérisation de l'actine. En effet, il a été observé que sur des cellules épithéliales [6] et endothéliales [98] la déplétion de l'ATP induisait une augmentation de la polymérisation de l'actine. D'après [98], la déplétion de l'ATP induit une destruction des fibres de stress mais crée une accumulation de filaments d'actine agrégés. La déplétion de l'ATP aurait donc l'effet inverse de la latrunculine.

Drogue	Nbre mesures	$A_1 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_1$	$A_2 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_2$
Control	122	$309\pm46$	$0.31 \pm 0.01$	$133\pm25$	$1.18 \pm 0.04$
Blebbistatine	53	$472\pm66$	$0.32 \pm 0.02$	$471\pm80$	$1.38 \pm 0.06$
ATP	10	$176 \pm 62$	$0.28 \pm 0.04$	$43\pm24$	$1.16 \pm 0.14$
Latrunculine	14	$423\pm136$	$0.27\pm0.01$	$97\pm88$	$1.16 \pm 0.1$

**TABLE 4.1** – Table des préfacteurs  $A_1$  et  $A_2$  et des exposants  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  pour respectivement le régime sous-diffusif et sur-diffusif pour une quantité de ligand RGD 1/40 à température ambiante. Les moyennes sont données  $\pm$ SE

Drogue	Nbre mesures	$A_1 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_1$	$A_2 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_2$
Control	77	$77\pm8$	$0.24\pm0.01$	$52\pm10$	$1.38 \pm 0.05$
Blebbistatine	39	$99\pm15$	$0.23\pm0.01$	$88\pm25$	$1.36 \pm 0.07$
ATP	38	$66\pm13$	$0.28\pm0.02$	$29\pm9$	$1.35\pm0.1$
Latrunculine	14	$308\pm83$	$0.3\pm0.02$	$253\pm102$	$1.23\pm0.1$

**TABLE 4.2 –** Même chose que le tableau ci-dessus pour une quantité de ligand RGD 1/20 à température ambiante.

Drogue	Nbre mesures	$A_1 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_1$	$A_2 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_2$
Control	66	$34\pm4$	$0.32\pm0.02$	$47\pm9$	$1.6 \pm 0.03$
Blebbistatine	38	$37\pm3$	$0.26 \pm 0.02$	$38\pm 6$	$1.42 \pm 0.07$
ATP	16	$36\pm8$	$0.35\pm0.05$	$87\pm68$	$1.49 \pm 0.1$

**TABLE 4.3 –** Même chose que le tableau ci-dessus pour une quantité de ligand RGD 1/10 à température ambiante.

Drogue	Nbre mesures	$J_0 (nm/pN)$	β
Control	37	$14.9 \pm 3.5$	$0.25\pm0.03$
Blebbistatine	29	$14.5 \pm 3.8$	$0.26 \pm 0.03$
ATP	8	$7.5 \pm 4.8$	$0.25\pm0.03$
Latrunculine	10	$21\pm7$	$0.22 \pm 0.06$

**TABLE 4.4** – Table du préfacteur  $J_0$  de l'exposant  $\beta$  pour la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  pour une quantité de ligand RGD 1/40 à température ambiante. Les moyennes sont données  $\pm$ SE.

Drogue	Nbre mesures	$J_0 (nm/pN)$	β
Control	39	$4.2 \pm 0.8$	$0.2\pm0.02$
Blebbistatine	20	$4.5 \pm 1.1$	$0.18 \pm 0.03$
ATP	17	$1.9 \pm 0.7$	$0.14 \pm 0.02$
Latrunculine	10	$9.9\pm2.6$	$0.22 \pm 0.04$

**TABLE 4.5 –** Même chose que le tableau ci-dessus pour une quantité de ligand RGD 1/20 à température ambiante.

Drogue	Nbre mesures	$J_0 (nm/pN)$	β
Control	43	$0.9\pm0.2$	$0.2\pm0.02$
Blebbistatine	28	$1\pm0.2$	$0.19 \pm 0.02$
ATP	11	$0.8 \pm 0.2$	$0.29 \pm 0.03$

**TABLE 4.6 –** Même chose que le tableau ci-dessus pour une quantité de ligand RGD 1/10 à température ambiante.

En regardant globalement les histogrammes 4.4, on remarque que plusieurs comportements dépendant de la concentration en ligand, décrits au chapitre 3, se retrouvent quel que soit le traitement pharmacologique. Tout d'abord, la valeur des préfacteurs  $A_1$  et  $J_0$ diminue quand la concentration de ligand augmente, ce qui signifie que plus la bille est attachée, plus le contact se rigidifie. On trouve de plus une corrélation entre la valeur de  $J_0$  et la valeur de l'exposant du régime sur-diffusif  $\alpha_2$ , montrant que plus l'attachement est rigide, plus la bille aura un mouvement dirigé. Ceci est vrai sauf pour les cellules droguées avec de la blebbistatine, sur lesquelles les billes sondent un milieu de plus en plus rigide sans que cela n'influence la directivité du mouvement.

#### Spectre de forces et écarts à l'équilibre

La combinaison des deux mesures de microrhéologie permet de déduire les spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  exercées sur la bille. Ceux-ci sont tracés sur la figure 4.5C pour des sondes avec une concentration RGD 1/40 et figure 4.6C pour une concentration RGD 1/20.

Le résultat remarquable est l'effet de la latrunculine pour la concentration RGD 1/40 (courbes vertes de la figure 4.5C). Nous avons vu que les spectres de forces mesurés  $\hat{S}_f(s)$ (trait plein) et les spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé) pour des expériences de contrôle (courbe bleue) s'écartent pour des temps  $\approx 1$  s. Quand l'actine est dépolymérisée, à la concentration RGD 1/40, le spectre de forces mesuré  $\hat{S}_f(s)$  se superpose presque sur toute l'échelle de temps au spectre de force à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ . Un léger écart est mesuré pour des fréquences supérieures à 0.1 Hz. Ce résultat est important, car en inhibant un processus biologique, nous avons réussi à agir sur presque toutes les forces d'origine biologique. Il en résulte que l'écart à l'équilibre  $\theta(s)$ , figure 4.5D (courbe verte), est égal à 1 sur la quasi totalité de la gamme de fréquences. Les forces agissant sur la sonde accrochée avec une quantité de RGD 1/40 sur des cellules traitées à la latrunculine sont à dominante thermique. Les forces d'origine biologique menant le système hors de l'équilibre thermodynamique sont mesurées pour des temps supérieurs à 10 s et leur amplitude ne dépasse pas le double des forces thermiques. À des temps plus courts, les forces biologiques sont soit inexistantes, soit noyées dans le bruit thermique. Ce résultat justifie l'idée que la dynamique de l'actine est impliquée dans l'activité hors-équilibre du système sonde-cortex.

Fort de ce résultat, nous constatons que les mesures avec latrunculine pour des sondes accrochées avec une concentration de ligand RGD 1/20 sont très surprenantes (courbes vertes de la figure 4.6C). Les caractéristiques des mesures de microrhéologie active sont pourtant les mêmes qu'à RGD 1/40 : le milieu sondé est plus déformable que pour les mesures sur des cellules de contrôle. Cependant, le spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  a les mêmes caractéristiques que les mesures de contrôle : aux temps courts il est identique au spectre de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  et s'en écarte aux temps longs. Il en résulte que la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  (figure 4.6D) de cellules droguées à la latrunculine (courbe verte) est identique à celle des cellules de contrôle.

Afin d'affiner la recherche des responsables biologiques de l'activité hors-équilibre, il faut regarder l'effet de la blebbistatine sur les spectres de forces à RGD 1/40 et à RGD 1/20

(courbes rouges de la figure 4.5C et courbes rouges de la figure 4.6C). Pour la concentration RGD 1/20, le spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  est similaire au spectre de forces pour les cellules de contrôle, l'écart à l'équilibre est donc presque identique. Pour la concentration RGD 1/40, alors que le spectre de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  est similaire au spectre de forces sur les cellules de contrôle, le spectre de forces mesurées  $\hat{S}_f(s)$  avec la combinaison des mesures de microrhéologie passive et active est, sur toute la gamme de fréquences au-dessus du spectre de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ . L'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  est alors toujours au-dessus de la courbe de contrôle.

À l'instar des mesures des spectres de forces sur des cellules droguées à la blebbistatine, la déplétion de l'ATP ne modifie pas significativement le système au point de le ramener à l'équilibre thermodynamique. À la concentration RGD 1/40 (courbes noires de la figure 4.5C et D), les spectres de forces pour des cellules pauvres en ATP et des cellules de contrôle sont similaires ainsi que les écarts à l'équilibre. À RGD 1/20, alors qu'on remarque des effets significatifs sur l'amplitude des fluctuations diminuant après la déplétion de l'ATP, aucun rapprochement du système vers l'équilibre n'est mesuré par rapport aux mesures de contrôle. En effet, il faut noter que la diminution des fluctuations de la sonde est accompagnée d'une augmentation de la rigidité et d'une diminution de la dissipation du milieu accroché à la bille par rapport aux cellules de contrôle.

## Discussion

Les résultats ci-dessus sont difficiles à interpréter et à unifier. Cependant, quelques éléments peuvent être dégagés. Tout d'abord, il est maintenant certain que la dépolymérisation de l'actine avec de la latrunculine pour des concentrations de ligand RGD 1/40 supprime la majeure partie des forces actives d'origine biologique et ramène le système à l'équilibre thermodynamique. Cela renforce à la fois notre approche théorique et expérimentale et l'idée que les forces exercées sur la bille sont transmises par les filaments d'actine. En revanche, l'effet de la latrunculine pour la concentration RGD 1/20 est tout autre. Nous pouvons émettre une hypothèse pour interpréter cette différence. Il se pourrait que le dosage en latrunculine soit trop faible et ne dépolymérise pas assez les filaments d'actine. Une bille qui a beaucoup de liens avec le cortex a plus de chances d'être reliée à un long filament. Pourtant l'effet de la latrunculine est plus prononcé pour les mesures à RGD 1/20 sur les mesures de microrhéologie active, avec une mesure de  $J_0^{1/20}$  augmentant de 136% après dépolymérisation alors que  $J_0^{1/40}$  augmente de 41%.

L'inhibition des myosines II n'a apparement aucun effet sur les mesures d'écart à l'équilibre. En première approximation, nous devrions conclure que les myosines II ne sont aucunement responsables des forces hors-équilibre mesurées lors des expériences de contrôle. Mais une chose est remarquable : alors que l'exposant  $\alpha_2$  du déplacement quadratique moyen de la partie sur-diffusive diminue systématiquement avec la quantité de ligand, il demeure constant  $\alpha_2 \approx 1.4$  quelle que soit la densité de RGD lorsque l'on ajoute de la blebbistatine dans le milieu cellulaire. Peut-être que la dose de blebbistatine est trop élevée et que les mesures sont accompagnées d'une rétraction globale de la cellule qui se détache du substrat. Cependant, visuellement aucun mouvement cellulaire global n'a été remarqué.



**FIGURE 4.5** – En A : moyennes géométriques de la transformée de Laplace de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  en fonction de la fréquence pour différents traitements pharmacologiques et pour une concentration de ligand RGD 1/40. En B : moyennes géométriques du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$ . En C : moyennes géométriques des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et des spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé). En D : moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s)/\hat{S}_{feq}(s)$ . La couleur bleue correspond aux mesures de contrôle, la couleur noire aux mesures sur des cellules appauvries en ATP, la couleur verte sur des cellules traitées à la latrunculine A et la couleur rouge sur des cellules droguées à la blebbistatine. Le nombre de mesures N utilisé pour le calcul des moyennes est : N = 37 pour les mesures de contrôle, N = 8 pour les mesures de déplétion de l'ATP, N = 10 pour les mesures avec la latrunculine et N = 29 pour les mesures avec la blebbistatine. Pour toutes ces mesures les billes sont recouvertes d'une concentration en ligand RGD 1/40 et l'échantillon est à température ambiante. Les traits pointillés fins correspondent aux erreurs standards.



**FIGURE 4.6** – En A : moyennes géométriques de la transformée de Laplace de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  en fonction de la fréquence pour différents traitements pharmacologiques et pour une concentration de ligand RGD 1/20. En B : moyennes géométriques du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$ . En C : moyennes géométriques des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et des spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé). En D : moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s)/\hat{S}_{feq}(s)$ . La couleur bleue correspond aux mesures de contrôle, la couleur noire aux mesures sur des cellules appauvries en ATP, la couleur verte sur des cellules traitées à la latrunculine A et la couleur rouge sur des cellules droguées à la blebbistatine. Le nombre de mesures N utilisé pour le calcul des moyennes est : N = 39 pour les mesures de contrôle, N = 17 pour les mesures de déplétion de l'ATP, N = 10 pour les mesures avec la latrunculine et N = 20 pour les mesures avec la blebbistatine. Pour toutes ces mesures les billes sont recouvertes d'une concentration en ligand RGD 1/20 et l'échantillon est à température ambiante. Les traits pointillés fins correspondent aux erreurs standards.

Carina Raupach dans sa thèse [80] mesure aussi un exposant autour de 1.4 pour des billes attachées au cytosquelette avec de la fibronectine et pour différents types de cellules droguées avec du ML-7, drogue inhibant aussi la myosine II. La myosine II pourrait-elle jouer un rôle dans la formation du contact entre les intégrines et les autres protéines liant l'actine (vinculine, paxiline, taline...)?

Les résultats des mesures sur les cellules appauvries en ATP sont surprenants : des effets sont mesurés sur à la fois la mesure de microrhéologie active et la mesure de microrhéologie passive mais l'écart à l'équilibre est identique entre les cellules de contrôle et les cellules pauvres en ATP. Pourtant l'ATP est connu pour être le carburant des processus actifs de la cellule. Cela nous rappel le résultat de Mizuno *et al.* qui mesurent avec un gel d'acto-myosine un écart à l'équilibre augmentant alors que la quantité d'ATP diminue (figure 3.19).

Nous avons essayé de caractériser l'effet des drogues, mais à part pour la dépolymérisation de l'actine, aucune inhibition de processus biologique n'est concluante. Nous allons regarder dans la partie suivante l'effet des drogues à température physiologique. À cette température, le métabolisme de la cellule est optimal, le blocage d'un processus biologique pourrait être plus contrasté.

# 4.3.3 Effet des drogues sur les mesures de microrhéologie à température physiologique

Dans cette partie, nous allons présenter l'effet de la déplétion de l'ATP et du BDM sur les cellules à température physiologique. Comme tout au long de ce travail, des mesures de microrhéologie passive et active sont faites sur des billes recouvertes d'une concentration RGD 1/20 et attachées à des cellules droguées. Ces mesures sont ensuite comparées aux résultats obtenus sur des cellules non-traitées. Le choix de la concentration RGD 1/20 pour l'étude à température physiologique s'explique par les résultats issus de la température ambiante. En effet, l'étude sur des sondes fortement attachées révélait des fluctuations aux temps courts au même niveau que notre niveau de détection. Aucun effet significatif de la blebbistatine et de la déplétion de l'ATP n'a par ailleurs été mesuré à cette concentration de ligand. Les résultats avec la concentration RGD 1/40 sont partiellement compris avec un retour du système à l'équilibre lorsque l'actine est dépolymérisée. Même si des zones d'ombre subsistent à cette concentration, celles-ci sont les mêmes que pour la concentration RGD 1/20, à savoir que ni la déplétion de l'ATP ni l'inhibition des myosines II ne ramènent le système à l'équilibre thermodynamique. De plus, l'amplitude des forces nonthermiques exercées sur la sonde à la concentration RGD 1/20 est supérieure à celle exercée à la concentration RGD 1/40, l'étude sur ce système présente donc plus d'intérêt.

Dans la partie suivante, les mesures sur des **cellules de contrôle** seront représentées sur les courbes en **bleu**, les mesures sur des **cellules appauvries en ATP (déplétion de l'ATP)** seront représentées par la couleur **noire**, les mesures sur des cellules droguées au **BDM** seront représentées par la couleur **rouge**.

### Résultats sur l'effet des drogues à température physiologique

Les moyennes géométriques des résultats des mesures de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$ issues des mesures de microrhéologie active sont représentées sur la figure 4.7A. Les valeurs du préfacteur  $J_0$  et de l'exposant  $\beta$  issues de l'ajustement de  $\hat{J}(s)$  sont résumées dans le tableau de la figure 4.8.

La déplétion de l'ATP à 37°C pour des sondes recouvertes d'une concentration en RGD 1/20 présente la même tendance qu'à température ambiante. Le milieu sondé par microrhéologie active est plus rigide après la déplétion de l'ATP. Le préfacteur de la fonction de réponse passe de la valeur  $J_0^{\text{control}} \approx 7.9 \text{ nm/pN} à J_0^{\text{ATP}} \approx 1.3 \text{ nm/pN}$ . De surcroît le milieu est plus proche d'un comportement élastique avec un exposant  $\beta_{\text{control}} \approx 0.29$  chutant à  $\beta_{\text{ATP}} \approx 0.18$ . Sur les figures 4.8C et D, sont représentés respectivement les histogrammes de  $J_0$  et  $\beta$  en fonction de la température et de la déplétion de l'ATP et du traitement au BDM. La rigidification et la la diminution de la dissipation dues à l'appauvrissement de l'ATP dans la cellule sont, à RGD 1/20, présentes aux deux températures mais sont plus marquées à 37°C. Entre l'expérience de contrôle et la déplétion de l'ATP, l'exposant  $\beta$ diminue de 38% à 37°C tandis qu'il diminue de 30% à 25°C et le préfacteur  $J_0$  diminue de 84% à 37°C et de 55% à 25°C.

L'effet du BDM sur les mesures actives semble aller dans le même sens que la déplétion de l'ATP mais est plus marqué. Les mesures décrivent un milieu encore plus rigide et encore moins dissipatif :

$$J_0^{\text{control}} \approx 7.9 \text{ nm/pN} > J_0^{\text{BDM}} \approx 0.3 \text{ nm/pN}$$
 et  $\beta_{\text{control}} \approx 0.29 > \beta_{\text{BDM}} \approx 0.15$ .

Les mesures de microrhéologie passive confirment le comportement observé à température ambiante. Le déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$  est tracé sur la figure 4.7B. Sur les figures 4.8A et B, sont représentés respectivement les histogrammes de  $A_2$  et  $\alpha_2$  en fonction de la température, de la déplétion de l'ATP et du traitement au BDM. L'amplitude des fluctuations des sondes attachées à des cellules pauvres en ATP est inférieure à celle mesurée sur des cellules de contrôle. Les déplacements quadratiques moyens ont été coupés en-dessous de  $\tau = 0.04$  s car les fluctuations aux temps courts se situent dans le niveau de bruit, donc seul le régime sur-diffusif est disponible. La valeur de l'exposant de la partie sur-diffusive pour les cellules pauvres en ATP est supérieure à celle des cellules de contrôle ( $\alpha_2^{\text{ATP}} \approx 1.53 > \alpha_2^{\text{control}} \approx 1.44$ ). Dans le même temps la valeur du préfacteur  $A_2$  diminue ( $A_2^{\text{ATP}} \approx 22nm^2 < A_2^{\text{control}} \approx 188nm^2$ ). L'effet du BDM va dans le même sens, diminuant encore l'amplitude des fluctuations, au point que le déplacement quadratique moyen, pour des temps inférieurs à 0.5 s, se situe dans le bruit de détection. La valeur du préfacteur  $A_2$  diminue fortement passant de  $A_2^{\text{control}} \approx 1.44$ ).

Le spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  et le spectre de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ , issus des mesures de microrhéologie sont tracés sur la figure 4.7C. Les spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  et  $\hat{S}_{feq}(s)$  se rejoignent aux temps courts pour les mesures effectuées sur les cellules de contrôle et sur les cellules appauvries en ATP, signature d'un système à l'équilibre. La mesure du spectre de forces pour les cellules droguées au BDM aux hautes fréquences n'est pas disponible



**FIGURE 4.7** – En A : moyennes géométriques de la transformée de Laplace de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  en fonction de la fréquence pour différents traitements pharmacologiques et pour une concentration de ligand RGD 1/20. En B : moyennes géométriques du déplacement quadratique moyen  $\Delta x^2(\tau)$ . En C : moyennes géométriques des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et des spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé). En D : moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s)/\hat{S}_{feq}(s)$ . La couleur bleue correspond aux mesures de contrôle, la couleur noire aux mesures sur des cellules appauvries en ATP et la couleur rouge sur des cellules droguées au BDM. Le nombre de mesures N utilisé pour le calcul des moyennes est : N = 124 pour les mesures de contrôle, N = 32 pour les mesures de déplétion de l'ATP et N = 20 pour les mesures avec du BDM. Pour toutes ces mesures les billes sont recouvertes d'une concentration en ligand RGD 1/20 et l'échantillon est à température physiologique ( $T = 37^{\circ}$ C). Les traits fins correspondent aux erreurs standards.

mais le spectre de forces  $\hat{S}_f(s)$  semble rejoindre celui de l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$ . L'ajustement aux basses fréquences du spectre de forces avec une loi de puissance nous permet d'estimer la fonction de corrélation des forces s'exerçant sur la sonde :  $\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t = c(\tau/\tau_0)^{\gamma}$ . Pour  $\tau_0 = 1$  s on obtient :

- pour les cellules de contrôle :  $c_{\text{control}} \approx 1.2 \text{pN}^2$  et  $\gamma_{\text{control}} \approx 0.8$ ;
- pour les cellules pauvres en ATP :  $c_{\text{ATP}} \approx 7 \text{pN}^2$  et  $\gamma_{\text{ATP}} \approx 0.8$ ;
- pour les cellules droguées avec du BDM :  $c_{\text{BDM}} \approx 35 \text{pN}^2$  et  $\gamma_{\text{BDM}} \approx 1 \text{ car } \hat{S}_f(s) \sim s^{-2}$ .

Cette valeur du spectre de forces en  $\hat{S}_f(s) \sim s^{-2}$  est particulière, car elle correspond à la pente du spectre de forces prévue par Lau *et al.* [55] et discutée dans la partie 1.3.4. Il est à noter que cette dépendance fréquentielle, en  $s^{-2}$ , mesurée par Lau *et al.* et par la suite par Schmidt et Mizuno *et al.* [67], qui est supposée être une loi universelle, est vérifiée pour la première fois dans cette étude et correspond à des mesures sur des cellules traitées avec du BDM.

La moyenne géométrique de l'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  mesurée pour les cellules pauvres en ATP (figure 4.7D) est toujours semblable à celle des cellules de contrôle. Encore plus surprenant, l'écart à l'équilibre mesuré sur des cellules traitées avec du BDM se trouve au dessus de cellules de contrôle.

## 4.3.4 Discussion

Les résultats à température physiologique sont à l'image de ceux obtenus à température ambiante. La déplétion de l'ATP semble avoir le même effet qu'à température ambiante aussi bien sur les mesures de microrhéologie passive qu'active. Les mesures de microrhéologie active sur des cellules pauvres en ATP conduisent à la même conclusion : le milieu sondé via la bille est plus rigide et moins dissipatif. Les éléments pour expliquer ce comportement ont déjà été explicités. Soit la déplétion de l'ATP interrompt le cycle des myosines dans leur état attaché augmentant ainsi le nombre de réticulants dans le cortex, soit elle augmente la polymérisation de l'actine [6, 98] ce qui augmenterait la densité de l'actine sous forme de filaments dans le cortex. Pour les mesures de microrhéologie passive, l'amplitude du déplacement quadratique moyen est largement en-dessous de celle mesurée sur des sondes attachées à des cellules non-traitées. Ce comportement est compréhensible aux temps courts, le système est à l'équilibre et la bille diffuse dans un fluide visco-élastique plus rigide après la déplétion de l'ATP. Aux temps longs, alors que l'amplitude reste plus faible que pour les mesures de contrôle, le mouvement est plus dirigé. À cette échelle de temps, le système n'est plus à l'équilibre et des forces non-thermiques agissent sur la sonde ce qui assure la directivité du mouvement. Ces forces non-thermiques devraient être atténuées par la déplétion de l'ATP, pourtant il n'en est rien. L'écart à l'équilibre reste invariablement identique à celui des cellules de contrôle.

L'effet du BDM est très difficile à interpréter car son mécanisme d'action n'est pas parfaitement établi. Il est cependant évident qu'il agit fortement sur le cytosquelette. Les fluctuations des sondes chutent et le milieu se rigidifie et devient moins dissipatif. Le résultat sur les mesures de microrhéologie active est en contradiction avec celui de Ingber *et* 

Drogue	Nbre mesures	$A_1 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_1$	$A_2 (\mathrm{nm}^2)$	$\alpha_2$
Control	156	$238\pm22$	$0.44 \pm 0.01$	$188\pm19$	$1.44 \pm 0.02$
ATP	32	N-A	N-A	$22\pm12$	$1.53\pm0.05$
BDM	31	N-A	N-A	$6\pm1$	$1.69\pm0.04$

Drogue	Nbre mesures	$J_0 (nm/pN)$	β
Control	124	$7.9 \pm 1.2$	$0.29\pm0.02$
ATP	32	$1.3 \pm 0.3$	$0.18 \pm 0.02$
BDM	20	$0.3 \pm 0.03$	$0.15\pm0.02$



**FIGURE 4.8** – Histogrammes représentant les valeurs de  $A_2$  (en A),  $\alpha_2$  (en B),  $J_0$  (en C) et  $\beta$  (en D) pour différentes concentrations de RGD (RGD 1/40, RGD 1/20, RGD 1/40) et pour différents traitements pharmacologiques : deoxyglucose et NaN<sub>3</sub> (déplétion de l'ATP) en noir, BDM en rouge et contrôle en bleu. Les valeurs  $A_2$  et  $\alpha_2$  correspondent respectivement au préfacteur et à l'exposant de la partie sur-diffusive du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau)$ . Les valeurs  $J_0$  et  $\beta$  correspondent au préfacteur et à l'exposant de la fonction de réponse  $J(\tau)$ . Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards. Les valeurs de ces histogrammes sont écrites dans la table au-dessus.

*al.* [64] qui mesurent, sur des billes magnétiques attachées au cortex, un déplacement des billes plus grand à force donnée pour des cellules traitées au BDM que pour des cellules de contrôle. Cette contradiction peut s'expliquer par la différence dans le dosage et le temps d'administration du BDM. Tandis que nous utilisons une concentration de BDM de 25 mM, ils utilisent 10 mM, et nous laissons la drogue agir 30 min alors qu'ils font la mesure de microrhéologie immédiatement après l'ajout du BDM. Comme pour la déplétion de l'ATP, l'écart à l'équilibre ne se rapproche pas de l'équilibre thermodynamique, il se trouve, au contraire, au-dessus de l'écart à l'équilibre mesuré sur des cellules de contrôle.

Tout ceci semble aller dans le sens de l'interprétation donnée au chapitre précédent en s'appuyant sur l'expérience de Mizuno et al. travaillant sur des gels d'actomyosines. Nous observons presque la même chose que lui, à savoir qu'une diminution de l'ATP dans la cellule ne ramène pas le système vers l'équilibre car dans le même temps les propriétés viscoélastiques du milieu étudié changent. Notre étude montre que pour une concentration de ligand RGD 1/20 le milieu devient moins déformable et moins dissipatif lors de la déplétion de l'ATP dans les cellules à température ambiante et à température physiologique (figure 4.8C et D). La diminution de l'activité biologique dans la cellule pourrait alors être compensée par une dissipation moindre. Si l'on imagine qu'un moteur moléculaire travaille en traction sur un filament d'actine, cette force sera ressentie différement par la sonde selon l'endroit où elle se trouve. En particulier, si elle se trouve trop loin du moteur moléculaire, le travail effectué par celui-ci sera totalement dissipé par le milieu. On peut alors définir le rayon d'action d'un moteur par la distance à partir de laquelle son travail est totalement dissipé par le milieu. On comprend que si le milieu est rendu moins dissipatif par une déplétion de l'ATP, alors le rayon d'action d'un moteur va augmenter. Lors de la déplétion de l'ATP, moins de moteurs sont susceptibles de travailler mais leur action se fera ressentir sur une plus grande distance. Cette explication peut permettre de comprendre pourquoi les mesures d'écart à l'équilibre sont les mêmes entre les expériences de contrôle et de déplétion de l'ATP. Dans un cas comme dans l'autre, la sonde va ressentir la force d'autant de moteurs, et la diminution du nombre de moteurs moléculaires effectifs est compensée par la diminution de la dissipation du milieu. Ce raisonnement est vrai si la déplétion de l'ATP dans le cytoplasme cellulaire n'est pas totale. La concentration en ATP dans la cellule après la déplétion n'a pas été mesurée.

Une façon différente et peut-être éclairante de présenter les résultats consiste à représenter la valeur de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  en fonction de  $\theta(s)$  dans le domaine fréquentiel où le système est hors-l'équilibre. En prenant arbitrairement s = 0.1 Hz, les couples de points  $\{\hat{J}(s), \theta(s)\}$  sont tracés sur la figure 4.9 pour des cellules de contrôle (bleu), des cellules droguées au BDM (rouge) et appauvries en ATP (noir). On remarque dans un premier temps que les couples de points sont regroupés en fonction du type de drogue utilisé. Pour les expériences de contrôle, plus la valeur de  $\hat{J}(s)$  est petite, plus  $\theta(s)$  est grand, c'est-à-dire moins le milieu est déformable et plus le sytème est hors-équilibre. Ceci avait été observé indirectement précédemment : la corrélation entre la rigidité du milieu et l'exposant  $\alpha_2$  du régime sur-diffusif. Cela corrobore l'idée que plus le milieu est rigide et plus les forces d'origine biologique qui s'exercent sur la sonde sont importantes. Alors qu'une relation en loi de puissance semble s'établir pour les expériences entre  $\theta(s)$  et  $\hat{J}(s)$ , un traitement phar-



**FIGURE 4.9** – Répartition des valeurs de la fonction de réponse  $\hat{J}(s)$  à 0.1 Hz (10 s) en fonction de la valeur de l'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  à 0.1 Hz (10 s) pour des expériences sur des cellules de contrôle (bleu), des cellules apprauvries en ATP (noir) et des cellules droguées au BDM (rouge). Les ellipses ont été obtenues par analyse en composantes principales sur le logarithme des grandeurs  $\hat{J}(s)$  et  $\theta(s)$  et en enlevant 10% des valeurs les plus éloignées des moyennes.

macologique bouleverse cette relation et la valeur de  $\theta(s)$  devient presque indépendante de  $\hat{J}(s)$ . On peut voir sur la figure 4.9 que la gamme de  $\hat{J}(s)$  mesurée est très grande pour les cellules de contrôle, et l'ajout de drogues modifie cette gamme. De plus, à  $\hat{J}(s)$  fixé dans la gamme de l'ATP (ou du BDM), le nuage de points des expériences de contrôle se situe audessus de celui des expériences de déplétion de l'ATP. Il en résulte que l'écart à l'équilibre des cellules de contrôle, à rigidité donnée, est supérieur à celui des expériences de déplétion de l'ATP. Cet effet est encore plus évident sur des cellules droguées au BDM. Dans le calcul des moyennes des fonctions d'écart à l'équilibre il y a donc un biais car les mesures de viscoélasticité des cellules non-traitées ont une répartition très différente et beaucoup plus large que celles traitées pharmacologiquement. Finalement, pour des cellules ayant une rigidité donnée, on trouve bien le résultat attendu, à savoir que l'écart à l'équilibre diminue lorsqu'on appauvrit l'ATP dans la cellule ou inhibe les moteurs moléculaires avec du BDM.

#### 4.4 Mesures de microrhéologie sur une même cellule avant et après traitement pharmacologique

Afin de mesurer plus précisément l'effet de la blebbistatine, nous avons entrepris de réaliser les mesures de microrhéologie passive puis active avant (mesure A) et après le traitement pharmacologique (mesure B) sur une même cellule. Il est ainsi possible de faire des mesures plus précises de l'effet de la blebbistatine. Dans un premier temps, nous avons donc effectué les mesures de microrhéologie sur une bille attachée à une cellule en condition de contrôle. Puis, après l'ajout de la blebbistatine agissant pendant 30 min, nous avons refait les mêmes mesures sur la même cellule et les mêmes billes. Ensuite, nous avons opéré l'expérience inverse en commençant par la blebbistatine puis nous avons rincé la cellule avec un milieu neutre afin de réactiver les myosines II. La dernière expérience est celle de contrôle où aucune drogue n'a été ajoutée entre les premières (mesure A) et les deuxièmes mesures de microrhéologie (mesure B).

Le nombre d'expérience N pour chaque type d'expérience :

- type 1 : contrôle (mesure A) contrôle (mesure B), N = 6 mesures
- type 2 : contrôle (mesure A) blebbistatine (mesure B), N = 39 mesures
- type 3 : blebbistatine (mesure A) contrôle (mesure B), N = 7 mesures

Le nombre de mesures pour les expériences de type 1 et 3 est assez faible, c'est pourquoi les résultats présentés ci-après ne sont que préliminaires.

#### 4.4.1 **Résultats expérimentaux**

Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure 4.10. Tout d'abord les résultats des mesures de microrhéologie active montrent que quel que soit le type d'expérience (ajout de drogues, changement de milieu cellulaire ou expérience de contrôle), le milieu se rigidifie entre la mesure A et la mesure B ( $J_0$  diminue) même si pour l'expérience de contrôle ce résultat n'est pas significatif :

- type 1 :  $J_0^A = 5.8 \pm 3.6 \text{ nm/pN} > J_0^B = 3.5 \pm 2.2 \text{ nm/pN}$ - type 2 :  $J_0^A = 7.6 \pm 1.8 \text{ nm/pN} > J_0^B = 4 \pm 0.4 \text{ nm/pN}$ - type 3 :  $J_0^A = 3.1 \pm 0.1 \text{ nm/pN} > J_0^B = 1.2 \pm 0.2 \text{ nm/pN}$ 

Par ailleurs l'exposant  $\beta$  de la fonction de réponse diminue sauf pour l'expérience de type 3 (remise en activité des myosines).

Pour la mesure de microrhéologie passive la donnée intéressante est le comportement de  $A_1$  (préfacteur de l'ajustement en loi de puissance dans la partie sous-diffusive du déplacement quadratique moyen) qui est sensiblement le même que celui de  $J_0$ . En effet, étant donné que le milieu se rigidifie et que le système est à l'équilibre, les fluctuations de la sonde diminuent. L'autre résultat intéressant est la variation de l'exposant  $\alpha_2$  dans la partie sur-diffusive du déplacement quadratique moyen. Pour l'expérience de type 1, cet exposant augmente, ce qui est en accord avec les résultats précédents : le mouvement de la bille est d'autant plus dirigé que le milieu est rigide. Il en est de même pour l'expérience de remise en activité des myosines (type 3). Cependant, l'effet de l'inhibition des myosines est tout à fait contraire, alors que le milieu devient moins déformable, l'exposant  $\alpha_2$  chute de  $1.53 \pm 0.04$  à  $1.3 \pm 0.05$ .

Les moyennes géométriques des spectres de forces issus de la combinaison des expériences de microrhéologie active et passive sont tracées sur les figures 4.11 A, C et F pour respectivement l'expérience de type 1, 2 et 3. Aux temps courts, les spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$ et  $\hat{S}_{feq}(s)$  se rejoignent : le système est à l'équilibre thermodynamique, les forces agissant sur la sonde sont d'origine thermique. L'ajustement aux temps longs (basses fréquences) du spectre de forces avec une loi de puissance  $S_f(s) = c'(s/s_0)^{\gamma'}$  nous donne la fonction de corrélation des forces s'exerçant sur la sonde :  $\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t = c(\tau/\tau_0)^{\gamma}$ . Pour  $\tau_0 = 1$  s on obtient :

- type 1 (contrôle-contrôle) :  $c_A \approx 0.5 \text{ pN}^2$  et  $c_B \approx 0.6 \text{ pN}^2$  ,  $\gamma_A \approx 0.8$  et  $\gamma_B \approx 1$
- type 2 (contrôle-blebbistatine) :  $c_A \approx 0.8 \text{ pN}^2$  et  $c_B \approx 1.5 \text{ pN}^2$ ,  $\gamma_A \approx 1$  et  $\gamma_B \approx 0.6$  type 3 (blebbistatine-contrôle) :  $c_A \approx 1.3 \text{ pN}^2$  et  $c_B \approx 1.9 \text{ pN}^2$ ,  $\gamma_A \approx 0.6$  et  $\gamma_B \approx 1$

Les moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = S_f(s)/S_{feq}(s)$ sont tracées sur les figures 4.11 B, D et F pour respectivement l'expérience de type 1, 2 et 3. Alors que pour l'expérience de type 1 l'écart ne semble pas chuter entre les deux séries de mesures, l'ajout de la blebbistatine dans l'expérience de type 2 rapproche le système de l'équilibre. Enfin, pour l'expérience de type 3, la fonction d'écart à l'équilibre aux basses fréquences dans le cas où les myosines sont remises en activité (mesure B) semble être au-dessus de celle où les myosines sont inhibées mais cela n'est pas significatif.

#### 4.4.2 Discussion

La mesure de microrhéologie active montre que le milieu se rigidifie toujours entre la mesure A et la mesure B. Ce résultat est vrai quelle que soit la drogue administrée aux cellules. Une possible interprétation est le renforcement du contact. En effet, Arcizet et al. [50] ont montré que l'application d'une force sur des billes recouvertes de RGD induisait un renforcement se traduisant par la rigidification du milieu sondé entourant la bille. De plus, en observant l'actine par épifluorescence et en mesurant conjointement la rigidification, ils ont démontré que celle-ci était corrélée à un recrutement d'actine au voisinage de la bille. Toutefois, ils ont observé que la rigidité augmentait d'un facteur  $\sim$  7 au bout d'environ 1000 s après plusieurs cycles d'application de la force pendant  $\tau = 150$  s. Dans notre expérience, la force est appliquée une seule fois pendant  $\tau = 25$  s et nous observons que le  $J_0$  diminue d'un facteur ~ 2 – 3 au bout de 1800 s. On ne peut pas imputer cette rigidification à une simple maturation du contact car les mesures de microrhéologie active effectuées soit 30 min soit 1h après la mise en contact des billes avec les cellules sont en moyenne identiques. La rigidification est donc bien un effet de recrutement dû à l'application de la force. Il est notable que seule une petite perturbation permette d'induire un renforcement.

Les mesures de microrhéologie passive mettent en évidence une chute de la directivité du mouvement de la bille (diminution de  $\alpha_2$ ) en présence de blebbistatine, suggérant que les myosines II sont impliquées dans le mouvement dirigé des sondes observées aux temps longs. En combinant les deux mesures, les moyennes des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  et  $\hat{S}_{feq}(s)$  nous permettent de confirmer qu'aux temps courts, le système est toujours à l'équi-



**FIGURE 4.10** – Histogrammes représentant les valeurs de  $\alpha_1$  (en a),  $\alpha_2$  (en b),  $J_0$  (en c) et  $\beta$  (en d) pour les trois types d'expériences avant (mesure A) et après ajout (éventuel) de drogues (mesure B). Les valeurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  correspondent respectivement aux exposants de la partie sous-diffusive et sur-diffusive du déplacement quadratique moyen  $\Delta R^2(\tau)$ . Les valeurs  $J_0$  et  $\beta$  correspondent au préfacteur et à l'exposant de la fonction de réponse  $J(\tau)$ . L'expérience de type 1 correspond à une mesure de microrhéologie passive et active sur une cellule de contôle puis, 30 min plus tard, une deuxième mesure est effectuée sur la même sonde. L'expérience de type 2 correspond à une mesure de microrhéologie passive et active sur une cellule de contôle et, après avoir laissé les cellules pendant 30 min dans un milieu pourvu de blebbistatine, une deuxième mesure est effectuée sur la même sonde. L'expérience de type 3 correspond à une mesure de microrhéologie passive et active sur des cellules traitées à la blebbistatine et, après avoir laissé les cellules pendant 30 min dans un milieu complet dépourvu de blebbistatine, une deuxième mesure est effectuée sur la même sonde. Le code couleur est indiqué dans l'encadré gris ci-dessus. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards. Les mesures ont été effetuées à 37°C pour des billes recouvertes d'une concentration RGD 1/20. Le nombre de mesures N utilisé pour le calcul des moyennes est : N = 6 pour l'expérience de type 1, N = 39 pour le type 2 et N = 7 pour le type 3.



**FIGURE 4.11** – En A, C et E : moyennes géométriques des spectres de forces  $\hat{S}_f(s)$  (trait plein) et des spectres de forces à l'équilibre  $\hat{S}_{feq}(s)$  (trait pointillé) pour respectivement les expériences de type 1, 2 et 3. En B, D et F : moyennes géométriques des fonctions d'écart à l'équilibre  $\theta(s) = \hat{S}_f(s)/\hat{S}_{feq}(s)$  pour respectivement les expériences de type 1, 2 et 3 (décrites dans la légende de la figure 4.10).

libre. Aux temps longs, la fonction d'autocorrélation  $\langle f(t+\tau)f(t)\rangle_t = c(\tau/\tau_0)^{\gamma}$  des forces exercées sur la bille révèle un comportement particulier. Alors que pour l'expérience de type 1 l'exposant  $\gamma$  de la fonction d'autocorrélation passe de 0.8 à 1, l'inhibition des myosines II le fait passer de 1 à 0.6 et la remise en activité des myosines le fait passer de 0.6 à 1. À la lumière de ces résultats, il apparaît que la myosine II joue un rôle dans le mouvement dirigé des sondes attachées à l'actine corticale.



FIGURE 4.12 – Moyenne des ratios des écarts à l'équilibre en fonction de la fréquence s. En rouge, la moyenne des ratios des écarts à l'équilibre  $\theta_{\text{control}}^A/\theta_{\text{blebb}}^B$  pour l'expérience de type 2 définis comme le quotient de l'écart à l'équilibre  $\theta^A_{\text{control}}(s)$  de l'expérience de contrôle (mesure A) et de l'écart à l'équilibre  $\theta^B_{\text{blebb}}(s)$  après inihibition des myosines II (mesure B). En bleu, la moyenne des ratios des écarts à l'équilibre  $\theta^A_{\text{control}}/\theta^B_{\text{control}}$  pour l'expérience de type 1. En vert, la moyenne des ratios des écarts à l'équilibre  $\theta^B_{\text{wash}}/\theta^A_{\text{blebb}}$  pour l'expérience de type 3 définis comme le quotient de l'écart à l'équilibre  $\theta^B_{\text{wash}}(s)$  après remise en activité des myosines II (mesure B) et de l'écart à l'équilibre de l'expérience  $\theta^A_{\text{blebb}}(s)$  après inihibition des myosines II (mesure A).

Afin de comparer proprement ces résultats, nous pouvons pour chaque type de mesure faire le rapport des fonctions d'écart à l'équilibre entre la mesure A et la mesure B :  $\theta^A(s)/\theta^B(s)$ . Pour les expériences de contrôle-contrôle (type 1), ce ratio doit être égal à 1. La figure 4.12 représente la moyenne géométrique des trois ratios :

- pour l'expérience de type 1, la fonction  $\theta^A_{\text{control}}/\theta^B_{\text{control}}$  est représentée en bleu ; pour l'expérience de type 2, la fonction  $\theta^A_{\text{control}}/\theta^B_{\text{blebbistatine}}$  est représentée en rouge ;

- pour l'expérience de type 3, la fonction  $\theta^B_{\text{wash}}/\theta^A_{\text{blebbistatine}}$  est représenté en vert<sup>5</sup>. Pour tous les types d'expérience, ce ratio est égal à 1 aux temps courts car le système billecellule est à l'équilibre thermodynamique. Aux temps longs, le ratio est presque égal à 1 pour l'expérience de contrôle (type 1), suggérant que l'écart à l'équilibre mesuré entre les mesures A et B est quasiment identique. Cependant, le nombre de mesures étant très petit, l'incertitude sur la valeur du rapport reste élevée. Pour l'expérience de type 2, le ratio est supérieur à 1 et atteint la valeur 6, ce qui veut dire que le système se rapproche de l'équilibre quand l'activité des myosines II est interrompue. Pour l'expérience de type 3, le ratio est égal à 1 sur presque la totalité de la gamme de fréquence mais semble augmenter aux basses fréquences. Cela veut dire que la remise en activité des myosines II augmente l'écart du système à l'équilibre, mais encore une fois le petit nombre de mesures ne nous permet pas de dire que cet effet est significatif. Cette figure montre que l'effet de la blebbistatine est visible et que la myosine II est une protéine impliquée dans l'activité hors-équilibre mesurée. Cette expérience prouve que l'effet inhibiteur de la blebbistatine est détectable et se traduit par une diminution de l'amplitude des forces générées, lorsqu'on sonde une même cellule dans des conditions de contrôle puis d'inhibition des moteurs, à la différence des moyennes effectuées sur plusieurs cellules, pour lesquelles les distributions de rigidité masquent l'effet recherché.

# 4.5 Conclusion

Le travail dans ce chapitre présente les résultats des expériences de microrhéologie sur des cellules où le métabolisme a été modifié afin de faire varier leur activité biologique. Plusieurs pistes ont été explorées. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de la température puis nous avons inhibé certains processus biologiques à l'aide de drogues. Ces traitements pharmacologiques nous ont permis d'appauvrir la quantité d'ATP dans les cellules, d'interrompre la polymérisation de l'actine ou d'inhiber l'activité des moteurs moléculaires myosines.

L'augmentation de la température a un effet certain sur les mesures de microrhéologie. À température physiologique le milieu cellulaire est à la fois plus déformable et plus dissipatif et l'on observe une augmentation de l'amplitude des fluctuations des sondes par rapport à la température ambiante. La combinaison des mesures de microrhéologie met en évidence une augmentation de la pente de la fonction de corrélation des forces exercées sur la sonde. Comme au chapitre précédent, nous observons aux temps courts, quelle que soit la température, un système à l'équilibre thermodynamique et aux temps long un système hors de l'équilibre. Cependant, l'écart à l'équilibre aux temps long est plus grand lorsque les cellules se trouvent à 37 °C. Ceci est la signature d'une activité biologique plus intense à température physiologique. Nous avons interprété ces résultats en supposant que les réactions chimiques responsables des forces stochastiques athermiques étaient ATP-dépendantes et que la cinétique de ces réactions était activée thermiquement.

<sup>5.</sup> Attention, pour l'expérience de type 3 le ratio  $(\theta^B(s)/\theta^A(s))$  a été défini autrement que pour les deux autres expériences  $(\theta^A(s)/\theta^B(s))$  car nous voulions avoir une fonction supérieure ou égale à 1.

Les résultats des mesures de microrhéologie active et passive sur les cellules droguées sont difficilement interprétables. Alors que des effets sont nets sur les deux types de mesures de microrhéologie, la combinaison des deux nous empêche de conclure quant à l'effet des drogues sur l'activité biologique. Cependant, la dépolymérisation de l'actine ramène le système à l'équilibre dans le cas particulier où la concentration en ligand est RGD 1/40. Cet effet n'est pas mesuré quand la concentration est RGD 1/20 mais les mesures de microrhéologie active montrent les mêmes effets qu'à RGD 1/40 à savoir que le milieu devient plus déformable. L'inhibition des myosines II par de la blebbistatine n'a pas d'effet probant à température ambiante. La déplétion de l'ATP dans les cellules a tendance à rigidifier le contact entre la sonde et la cellule et à diminuer l'amplitude des fluctuations sur toute la gamme temporelle. Malgré ces effets, la fonction d'écart à l'équilibre ne diminue pas après la déplétion de l'ATP. Cependant en observant les valeurs des fonctions de réponses  $\hat{J}(s)$  à 0.1Hz en fonction de celles de la fonction d'écart à l'équilibre  $\theta(s)$  nous avons remarqué une différence dans les moyennes d'écart à l'équilibre. La répartition de ces valeurs est différente entre des cellules de contrôle et des cellules droguées. La donnée intéressante est qu'à rigidité fixée la valeur de l'écart à l'équilibre diminue lorsque les cellules sont appauvrie en ATP ou lorsqu'elles sont traitées au BDM. La dernière partie de ce chapitre présente les résultats des expériences sur une même cellule et une même sonde avant et

après ajout de la blebbistatine. Ces expériences montrent une contribution des myosines II à l'activité hors-équilibre mesurée. En effet, nous avons montré que l'écart à l'équilibre diminuait après l'inhibition des myosines II. Cette étude montre que l'effet des drogues peut être masqué par des effets liés à la ri-

Cette etude montre que l'effet des drogues peut etre masque par des effets lies à la figidité. Il est possible de s'en affranchir soit en se plaçant à  $\hat{J}(s)$  constant soit en effectuant des mesures exactement sur une même cellule. Enfin, nous n'avons pas exploré tous les acteurs biologiques. La sonde étant accrochée à l'actine corticale, nous nous sommes focalisé sur les filaments d'actines et les moteurs moléculaires agissant sur l'actine. Nous avons peut-être négligé le rôle des microtubules dans l'activité hors-équilibre mesurée. Il serait intéressant de refaire quelques expériences en utilisant du nocodazole, drogue permettant de stopper la polymérisation des microtubules.

# CHAPITRE **5** Conclusion

L'étude des systèmes hors-équilibre est un domaine très étendu : des verres aux granulaires, en passant par les systèmes biologiques. La dynamique du cytosquelette est un grand sujet d'étude à la fois expérimental et théorique. En effet, c'est un élément essentiel de la cellule lui donnant son ossature et lui permettant d'exercer des forces sur son environnement. Cet objet est très complexe du point de vue de la biologie, composé de plusieurs sortes de protéines formant des filaments réticulés accompagnés de moteurs moléculaires. Le cytosquelette est aussi complexe au niveau de son étude physique, en témoigne sa rhéologie et les forces stochastiques prenant lieu en son sein.

Dans cette thèse nous avons étudié les forces athermiques s'exerçant sur une bille attachée aux filaments d'actine par l'intermédiaire des protéines transmembranaires : les intégrines. Nous avons pu, grâce à l'application d'une force par une pince optique, mesurer la fonction de réponse du milieu entourant la bille. En supposant que le système conserve la même fonction de réponse à l'équilibre thermodynamique, nous avons calculé le spectre des forces thermiques s'exercant sur la sonde en utilisant le théorème fluctuationdissipation. En combinant la mesure de la fonction de réponse avec une mesure de microrhéologie passive, nous avons calculé le spectre des forces s'exerçant réellement sur la sonde. Ces mesures ont permis de montrer qu'aux temps courts ( $\leq 1$  s), le spectre des forces mesuré  $\hat{S}_f(s)$  était égal au spectre des forces thermiques  $\hat{S}_{feq}(s)$ , ce qui implique que le système se comporte comme à l'équilibre thermodynamique. À cette échelle de temps, seules les forces d'origine thermique sont mesurées. Pour des temps longs ( $\gtrsim 1$  s), le spectre des forces est au-dessus du spectre des forces à l'équilibre, le système est mesuré hors de l'équilibre. Les forces s'exerçant sur la bille trouvent donc une autre origine que le bruit thermique : ce sont les éléments actifs du cytosquelette qui exercent des forces biologiques. Afin d'étudier plus en détail ce système de bille subissant des forces de la part de l'actine corticale, nous avons étudié l'effet de la variation de la densité de ligand recouvrant la bille. Aux temps courts, quelle que soit la concentration de ligand, le sytème se comporte comme à l'équilibre. Aux temps longs, plus la bille est fortement attachée au cytosquelette, plus le système s'écarte de l'équilibre, en d'autres termes plus les forces d'origine biologique sont grandes.

La question qui nous a animés tout au long de ce travail est l'origine de ces forces biologiques ou plus exactement la nature du composant du cytosquelette qui exerce ces forces athermiques. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la température sur ces forces biologiques, et nous avons remarqué qu'à température physiologique, celles-ci étaient plus intenses. Ceci s'explique lorsqu'on comprend que toutes ces réactions utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP et menant le système loin de l'équilibre, ont des vitesses qui augmentent avec la température. Nous avons ensuite étudié l'effet de la déplétion de l'ATP dans la cellule, de la dépolymérisation de l'actine et de l'inhibition des moteurs moléculaires de la famille des myosines. La dépolymérisation de l'actine peut dans un cas particulier (concentration RGD 1/40) éliminer toutes les forces biologiques et donc ramener le système à l'équilibre. La déplétion en ATP, au premier abord, ne diminue pas les forces d'origine biologique par rapport aux forces thermiques. Cependant, en se plaçant à rigidité constante, nous avons remarqué que l'écart à l'équilibre diminuait lorsque la quantité d'ATP dans la cellule diminuait. Pour améliorer la comparaison entre les expériences sur des cellules de contrôle et des cellules droguées, nous avons fait des mesures de microrhéologie sur une même cellule et une même sonde avant et après traitement à la blebbistatine, un inhibiteur des myosines II. Ces expériences originales ont permis de montrer une contribution des myosines II dans les forces biologiques s'exerçant sur les sondes.

Ce travail essentiellement expérimental porte sur les aspects hors-équilibre d'un objet aussi complexe que le cytosquelette. Nous avons essayé d'étudier en détail les forces s'exerçant sur une bille micrométrique aussi bien celles d'origine thermique que biologique. En faisant varier un maximum de paramètres expérimentaux, nous avons mis en évidence des comportements originaux. Le maillon manquant de cette thèse est donc l'élaboration d'un modèle théorique pouvant s'ajuster exactement à nos expériences, notamment l'effet de la densité de ligand entre la cellule et la sonde. Une idée serait de faire une synthèse du modèle de la cage (partie 3.3.3) et du modèle de Robert *et al.* (partie 3.3.5) à laquelle on ajouterait un bruit thermique comparable à celui mesuré. L'effet des forces thermiques serait alors additionné au bruit coloré des forces biologiques, nous pourrions retrouver dans des simulations les deux régimes du spectre des forces qui passe du spectre des forces thermiques au spectre des forces athermiques.

Au-delà des interprétations théoriques, il serait intéressant de finaliser le côté expérimental en étudiant la contribution des microtubules. Dans un souci de reproductibilité des mesures, il serait remarquable d'effectuer les mesures sur des cellules ayant toujours la même géométrie d'adhésion et sur des sondes se situant toujours dans les mêmes zones de la cellules. Cette expérience est réalisable techniquement, en confinant la cellule à une géométrie donnée sur des motifs de fibronectine et en choisissant avec la pince optique l'endroit exact d'adhésion des sondes.

Une autre piste à explorer concerne le traitement des données. En effet, les centaines de trajectoires de billes enregistrées pourraient être analysées plus finement en étudiant en détail les distributions de pas. Il serait aussi intéressant de travailler sur les trajectoires individuellement afin de caractériser leurs comportements. Par exemple, existe-t-il des périodes où la sonde a un comportement strictement confiné ou complètement directif ? Des études préliminaires ont été effectuées et semblent conclure qu'il n'y a pas de régimes complètement directifs suivi de régimes complètement confinés dans les trajectoires des sondes. Il serait intéressant de faire une étude systématique car cela pourrait nous donner des informations complémentaires sur la nature des processus biologiques.

# Bibliographie

- M. Abercrombie, J. E. M. Heaysman, and S. M. Pegrum. The locomotion of fibroblasts in culture : IV. electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2) :359–367, August 1971. 7
- [2] A. J. B. Alberts. Molecular biology of the cell, 2002. 14
- [3] S. S. An, R. E. Laudadio, J. Lai, R. A. Rogers, and J. J. Fredberg. Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283(3):C792 –C801, 2002. 99
- [4] R. Ananthakrishnan, J. Guck, and J. Käs. Cell mechanics : Recent advances with a theoretical perspective. *Soft Matter*, 661(2) :39–69, 2006. 27
- [5] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a singlebeam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5):288– 290, May 1986. 41
- [6] S. J. Atkinson, M. A. Hosford, and B. A. Molitoris. Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7):5194 –5199, February 2004. 103, 113
- [7] M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon, and F. Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 74(2 Pt 1) :021911, August 2006. 22, 30, 59, 78
- [8] M. Balland, A. Richert, and F. Gallet. The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European Biophysics Journal : EBJ*, 34(3):255–261, May 2005. 103
- [9] A. R. Bausch, W. Möller, and E. Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1):573–579, January 1999. 27
- [10] A. R. Bausch, F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75(4) :2038–2049, October 1998. 27
- [11] C. Brakebusch and R. Fassler. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*, 22(10) :2324–2333, May 2003. 16

- [12] D. Bray and JG White. Cortical flow in animal cells. *Science*, 239(4842):883–888, February 1988. 7
- [13] P. Bursac, B. Fabry, X. Trepat, G. Lenormand, J. P. Butler, N. Wang, J. J. Fredberg, and S. S. An. Cytoskeleton dynamics : Fluctuations within the network. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(2) :324–330, April 2007. 58, 74, 75, 78
- [14] P. Bursac, G. Lenormand, B. Fabry, M. Oliver, D. A. Weitz, V. Viasnoff, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell. *Nat Mater*, 4(7):557–561, July 2005. 33, 35, 58, 84, 93, 94, 101
- [15] M. F. Carlier and D. Pantaloni. Control of actin dynamics in cell motility. *Journal of Molecular Biology*, 269(4):459–467, June 1997. 10
- [16] A. Caspi, R. Granek, and M. Elbaum. Diffusion and directed motion in cellular transport. *Physical Review E*, 66(1):011916, July 2002. 32, 33
- [17] D. T. N. Chen, Q. Wen, P. A. Janmey, J. C. Crocker, and A. G. Yodh. Rheology of soft materials. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 1 :301–322, August 2010. 27
- [18] R. E. Cheney, M. A. Riley, and M. S. Mooseker. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 24(4) :215–223, 1993. 13
- [19] S. Chu, L. Hollberg, J. E. Bjorkholm, A. Cable, and A. Ashkin. Three-dimensional viscous confinement and cooling of atoms by resonance radiation pressure. *Physical Review Letters*, 55(1):48–51, July 1985. 41
- [20] P. Cicuta and A. M. Donald. Microrheology : a review of the method and applications. *Soft Matter*, 3 :1449, 2007. 27
- [21] M. F. Coughlin, M. Puig-de-Morales, P. Bursac, M. Mellema, E. Millet, and J. J. Fredberg. Filamin-A and rheological properties of cultured melanoma cells. *Bio-physical Journal*, 90(6) :2199–2205, March 2006. 75
- [22] F. H. C. Crick. The physical properties of cytoplasm. a. study by means of the magnetic particle method. part II. theoretical treatment. *Experimental Cell Research*, 1(4):505–533, 1950. 27
- [23] F. H. C. Crick and A. F. W. Hughes. The physical properties of cytoplasm : A. study by means of the magnetic particle method part I. experimental. *Experimental Cell Research*, 1(1):37–80, 1950. 27
- [24] J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh, and D. A. Weitz. Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Physical Review Letters*, 85(4):888–891, July 2000. 28
- [25] A. H. B. de Vries, B. E. Krenn, R. van Driel, and J. S. Kanger. Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical Journal*, 88(3):2137– 2144, March 2005. 27
- [26] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios. Creep function of a single living cell. *Biophysical Journal*, 88(3) :2224–2233, March 2005. 27, 28, 30, 56, 71, 78

- [27] A. J. Engler, S. Sen, H. Lee Sweeney, and D. E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126:677–689, August 2006. 18
- [28] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 87(14) :148102, 2001. 32, 33, 75
- [29] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E*, 68(4):041914, October 2003. 103
- [30] B. Fabry, G. N. Maksym, S. A. Shore, P. E. Moore, R. A. Jr Panettieri, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Selected contribution : time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology*, 91(2) :986–994, August 2001. 27
- [31] W. Feneberg, M. Westphal, and E. Sackmann. Dictyostelium cells' cytoplasm as an active viscoplastic body. *European Biophysics Journal : EBJ*, 30(4) :284–294, August 2001. 27
- [32] R. Feynman. The Feynman lectures on physics. Addison-Wesley Pub. Co., Reading Mass., 1963. 16
- [33] J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich. Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467) :113–119, March 1994. 13, 41, 82
- [34] P. W. Flatman. The effects of metabolism on Na(+)-K(+)-Cl- co-transport in ferret red cells. *The Journal of Physiology*, 437 :495–510, June 1991. 97
- [35] A. Forer and L. Fabian. Does 2,3-butanedione monoxime inhibit nonmuscle myosin? *Protoplasma*, 225(1-2):1–4, April 2005. 99
- [36] J. A. Freund and T. Pöschel. Stochastic processes in physics, chemistry, and biology. Springer, November 2000. 16
- [37] M. Furch, M. A. Geeves, and D. J. Manstein. Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry*, 37(18):6317–6326, May 1998. 99
- [38] N. Gal and D. Weihs. Experimental evidence of strong anomalous diffusion in living cells. *Physical Review E*, 81(2) :020903, February 2010. 27
- [39] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1):21–33, January 2009. 7
- [40] A. Gennerich, A. P. Carter, S. L. Reck-Peterson, and R. D. Vale. Force-Induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell*, 131 :952–965, November 2007.
  41
- [41] L. P. Ghislain and W. W. Webb. Scanning-force microscope based on an optical trap. *Optics Letters*, 18(19):1678–1680, October 1993. 41

- [42] K. D. Girard, S. C. Kuo, and D. N. Robinson. Dictyostelium myosin II mechanochemistry promotes active behavior of the cortex on long time scales. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(7) :2103 –2108, February 2006. 58
- [43] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, and J. Howard. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of Cell Biology*, 120(4) :923–934, February 1993. 7
- [44] A. Heilbronn. Eine neue Methode zur Bestimmung der Viskosität lebender Protoplasten. 1922. 27
- [45] R. M. Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33(1):15–22, January 2000. 27
- [46] B. D. Hoffman and J. C. Crocker. Cell mechanics : dissecting the physical responses of cells to force. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11 :259–288, 2009. 27, 29, 31
- [47] B. D. Hoffman, G. Massiera, and J. C. Crocker. Fragility and mechanosensing in a thermalized cytoskeleton model with forced protein unfolding. *Physical Review E*, 76(5):051906, November 2007. 94
- [48] B. D. Hoffman, G. Massiera, K. M. Van Citters, and J. C. Crocker. The consensus mechanics of cultured mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27) :10259–10264, July 2006. 30, 31, 78
- [49] D. Icard Arcizet. Modifications mécaniques et biologiques induites dans des cellules en culture par application locale d'une force contrôlée. PhD thesis, November 2007. 43, 49, 74, 78
- [50] D. Icard-Arcizet, O. Cardoso, A. Richert, and S. Hénon. Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophysical Journal*, 94 :2906– 2913, April 2008. 61, 71, 78, 118
- [51] S. Johansson, G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik, and L. Lohikangas. Fibronectin-integrin interactions. *Frontiers in Bioscience : A. Journal and Virtual Library*, 2 :d126–146, March 1997. 15
- [52] M. Kaksonen, C. P. Toret, and D. G. Drubin. Harnessing actin dynamics for clathrinmediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(6):404–414, June 2006. 10
- [53] M. Kovács, J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia, and J. R. Sellers. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34):35557 –35563, 2004. 98, 99
- [54] O. Kranenburg, M. Poland, M. Gebbink, L. Oomen, and W. H. Moolenaar. Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *Journal of Cell Science*, 110(19) :2417 –2427, October 1997. 49

- [55] A. W. C. Lau, B. D. Hoffman, A. Davies, J. C. Crocker, and T. C. Lubensky. Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells. *Physical Review Letters*, 91(19):198101, November 2003. 32, 33, 113
- [56] R. E. Laudadio, E. J. Millet, B. Fabry, S. S. An, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Rat airway smooth muscle cell during actin modulation : rheology and glassy dynamics. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289(6) :C1388 –C1395, December 2005. 103
- [57] G. Lenormand, J. Chopin, P. Bursac, J. J. Fredberg, and J. P. Butler. Directional memory and caged dynamics in cytoskeletal remodelling. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(4) :797–801, September 2007. 58
- [58] G. Lenormand and J. J. Fredberg. Deformability, dynamics, and remodeling of cytoskeleton of the adherent living cell. *Biorheology*, 43(1):1–30, 2006. 27
- [59] G. Lenormand, E. Millet, B. Fabry, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Linearity and time-scale invariance of the creep function in living cells. *Journal of The Royal Society Interface*, 1(1):91–97, November 2004. 103
- [60] S. Liu, D. A. Calderwood, and M. H. Ginsberg. Integrin cytoplasmic domainbinding proteins. *Journal of Cell Science*, 113(20):3563 –3571, October 2000. 15
- [61] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, 79(1):144–152, July 2000. 18
- [62] G. N. Maksym, B. Fabry, J. P. Butler, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, J. D. Laporte, and J. J. Fredberg. Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 hz. *Journal of Applied Physiology*, 89(4):1619–1632, October 2000. 27
- [63] T. G. Mason and D. A. Weitz. Optical measurements of Frequency-Dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical Review Letters*, 74(7) :1250, February 1995. 25
- [64] B. D. Matthews, D. R. Overby, R. Mannix, and D. E. Ingber. Cellular adaptation to mechanical stress : role of integrins, rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *Journal of Cell Science*, 119(3) :508 –518, February 2006. 115
- [65] R. E. McConnell and M. J. Tyska. Leveraging the membrane-cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends in cell biology*, 20(7):418–426, July 2010. 13
- [66] C. Metzner, C. Raupach, D. Paranhos Zitterbart, and B. Fabry. Simple model of cytoskeletal fluctuations. *Physical Review E*, 76(2):021925, 2007. 58
- [67] D. Mizuno, R. Bacabac, C. Tardin, D. Head, and C. F. Schmidt. High-Resolution probing of cellular force transmission. *Physical Review Letters*, 102(16) :168102, April 2009. 19, 84, 113
- [68] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. MacKintosh. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, 315(5810) :370 –373, January 2007. 34, 36, 84, 85, 88

- [69] A. Mogilner and G. Oster. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophysical Journal*, 71(6):3030–3045, December 1996. 9
- [70] P. B. Moore, H. E. Huxley, and D. J. DeRosier. Three-dimensional reconstruction of f-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *Journal of Molecular Biology*, 50(2):279–295, June 1970. 5
- [71] H. MORI. Transport, collective motion, and brownian motion. *Progress of theore*tical physics, 33(3):423–455, March 1965. 18
- [72] E. M. Ostap. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(4):305–308, 2002. 98
- [73] A. Palmer, J. Xu, and D. Wirtz. High-frequency viscoelasticity of crosslinked actin filament networks measured by diffusing wave spectroscopy. *Rheologica Acta*, 106(2):97–106, 1998. 31
- [74] C. S. Peskin, G. M. Odell, and G. F. Oster. Cellular motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophysical Journal*, 65(1) :316–324, July 1993. 9
- [75] T. D. Pollard. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *The Journal of Cell Biology*, 103(6 Pt 2) :2747–2754, December 1986. 5, 8
- [76] T. D. Pollard and G. G. Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4) :453–465, February 2003. 11
- [77] T. D. Pollard and M. S. Mooseker. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *The Journal of Cell Biology*, 88(3):654–659, March 1981. 5, 8
- [78] U. S. Potard, J. P. Butler, and N. Wang. Cytoskeletal mechanics in confluent epithelial cells probed through integrins and e-cadherins. *American Journal of Physiology* - *Cell Physiology*, 272(5) :C1654 –C1663, May 1997. 27
- [79] M. Puig-de-Morales, E. Millet, B. Fabry, D. Navajas, N. Wang, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Cytoskeletal mechanics in adherent human airway smooth muscle cells : probe specificity and scaling of protein-protein dynamics. *American Journal* of Physiology. Cell Physiology, 287(3) :C643–654, September 2004. 75, 103
- [80] C. Raupach. On the spontaneous motion of cytoskeletally bound markers. PhD thesis, Nürnberg, Univ., Diss., 2008. 110
- [81] C. Raupach, D. P. Paranhos Zitterbart, C. T. Mierke, C. Metzner, F. A. Müller, and B. Fabry. Stress fluctuations and motion of cytoskeletal-bound markers. *Physical Review E*, 76(1):011918, July 2007. 58
- [82] C. Revenu, R. Athman, S. Robine, and D. Louvard. The co-workers of actin filaments : from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8) :635–646, 2004.
  9
- [83] D. Robert, T. H. Nguyen, F. Gallet, and C. Wilhelm. In vivo determination of fluctuating forces during endosome trafficking using a combination of active and passive microrheology. *PLoS ONE*, 5(4) :e10046, April 2010. 27, 35, 38, 82, 84

- [84] D. Robert and C. Wilhelm. Numerical simulations of vesicular driving forces inside living cells. 6th World Congress of Biomechanics (WCB 2010). August 1-6, 2010 Singapore, pages 1083–1086, 2010. 82
- [85] T. Sakamoto, J. Limouze, C. A. Combs, A. F. Straight, and J. R. Sellers. Blebbistatin, a myosin II inhibitor, is photoinactivated by blue light. *Biochemistry*, 44(2):584– 588, 2004. 144
- [86] L. C. Schlichter, P. A. Pahapill, and I. Chung. Dual action of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on k+ current in human t. lymphocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(2) :438–446, May 1992. 99
- [87] J. R. Sellers. Myosins : a diverse superfamily. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1496(1):3–22, March 2000. 13
- [88] M. P. Sheetz, D. B. Wayne, and A. L. Pearlman. Extension of filopodia by motor dependent actin assembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(3) :160–169, January 1992. 7
- [89] P. Sollich. Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Physical Review E*, 58(1):738–759, July 1998. 94
- [90] P. Sollich, F. Lequeux, P. Hébraud, and M. E. Cates. Rheology of soft glassy materials. *Physical Review Letters*, 78(10) :2020–2023, March 1997. 94
- [91] L. Soret. Recherches sur l'élasticité et la cohésion des corps solides, volume 25 of Archives des sciences physiques et naturelles, pages 40–58. J. Cherbuliez, Genève, Janvier 1854. 27
- [92] T. M. Squires and T. G. Mason. Fluid mechanics of microrheology. Annual Review of Fluid Mechanics, 42:413–438, January 2010. 25, 27
- [93] M. T. Stapleton, C. M. Fuchsbauer, and A. P. Allshire. BDM drives protein dephosphorylation and inhibits adenine nucleotide exchange in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 275(4) :H1260 –H1266, October 1998. 99
- [94] R. W. Stroetz, N. E. Vlahakis, B. J. Walters, M. A. Schroeder, and R. D. Hubmayr. Validation of a new live cell strain system : characterization of plasma membrane stress failure. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(6) :2361– 2370, June 2001. 94
- [95] S. X. Sun, S. Walcott, and C. W. Wolgemuth. Cytoskeletal cross-linking and bundling in Motor-Independent contraction. *Current Biology*, 20(15) :R649–R654, August 2010. 11, 12
- [96] R. Sunyer, F. Ritort, R. Farré, and D. Navajas. Thermal activation and ATP dependence of the cytoskeleton remodeling dynamics. *Physical Review E*, 79(5):051920, May 2009. 96
- [97] R. Sunyer, X. Trepat, J. J. Fredberg, R. Farré, and D. Navajas. The temperature dependence of cell mechanics measured by atomic force microscopy. *Physical Biology*, 6(2) :025009, July 2009. 94

- [98] M. V. Suurna, S. L. Ashworth, M. Hosford, R. M. Sandoval, S. E. Wean, B. M. Shah, J. R. Bamburg, and B. A. Molitoris. Cofilin mediates ATP depletion-induced endothelial cell actin alterations. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 290(6) :F1398 –F1407, June 2006. 103, 113
- [99] T. M. Svitkina and G. G. Borisy. Arp2/3 complex and actin depolymerizing Factor/Cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *The Journal of Cell Biology*, 145(5) :1009–1026, May 1999. 10
- [100] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23 :247–285, 1994. 43, 47
- [101] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448) :721–727, October 1993. 41
- [102] J. A. Theriot and T. J. Mitchison. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, 352(6331) :126–131, July 1991. 9
- [103] J. A. Theriot, T. J. Mitchison, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy. The rate of actin-based motility of intracellular listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 357(6375):257–260, May 1992. 9
- [104] J. A. Theriot, J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. J. Mitchison. Involvement of profilin in the actin-based motility of l. monocytogenes in cells and in cell-free extracts. *Cell*, 76(3) :505–517, February 1994. 10
- [105] P. Thomen, P. J. Lopez, and F. Heslot. Unravelling the mechanism of RNA-Polymerase forward motion by using mechanical force. *Physical Review Letters*, 94(12):128102, April 2005. 41
- [106] X. Trepat, M. Grabulosa, L. Buscemi, F. Rico, R. Farré, and D. Navajas. Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells. *Journal of Applied Physiology*, 98(4):1567–1574, April 2005. 27
- [107] Y. Tseng, T. P. Kole, and D. Wirtz. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical Journal*, 83(6):3162–3176, December 2002. 27
- [108] V., J. Etienne, A. Duperray, and L. Preziosi. Review : Rheological properties of biological materials. *Comptes Rendus Physique*, 10:790–811, November 2009. 27
- [109] P. Vallotton, G. Danuser, S. Bohnet, J. J. Meister, and A. B. Verkhovsky. Tracking retrograde flow in keratocytes : News from the front. *Molecular Biology of the Cell*, 16(3) :1223 –1231, March 2005. 11
- [110] K. Visscher, M. J. Schnitzer, and S. M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 400(6740) :184–189, July 1999. 13
- [111] N. E. Vlahakis, M. A. Schroeder, R. E. Pagano, and R. D. Hubmayr. Role of deformation-induced lipid trafficking in the prevention of plasma membrane stress failure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(9):1282– 1289, November 2002. 94

- [112] T. A. Waigh. Microrheology of complex fluids. *Reports on Progress in Physics*, 68:685–742, March 2005. 27
- [113] N. Wang, J. P. Butler, and D. E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111) :1124 –1127, May 1993. 27
- [114] Y. L. Wang. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts : possible role of treadmilling. *The Journal of Cell Biology*, 101(2):597–602, August 1985.
- [115] F. Weber. Das fadenziehen und die viskosität des protoplasmas. Österreichische Botanische Zeitschrift, 70 :172–180, June 1921. 27
- [116] A. Wegner. Head to tail polymerization of actin. Journal of Molecular Biology, 108(1):139–150, November 1976.
- [117] M. T. Wei, A. Zaorski, H. C. Yalcin, J. Wang, M. Hallow, S. N. Ghadiali, A. Chiou, and H. D. Ou-Yang. A. comparative study of living cell micromechanical properties by oscillatory optical tweezers. *Optics Express*, 16(12):8594–8603, June 2008. 27
- [118] D. Weihs, T. G. Mason, and M. A. Teitell. Bio-Microrheology : a. frontier in microrheology. *Biophysical Journal*, 91 :4296–4305, December 2006. 27
- [119] G. Wertheim. *Mémoire sur l'élasticité et la cohésion des principaux tissus du corps humain.* 1847. 27
- [120] C. Wilhelm, F. Gazeau, and J. C. Bacri. Rotational magnetic endosome microrheology : Viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E*, 67(6) :061908, June 2003. 27
- [121] L. G. Wilson and W. C. K. Poon. Small-world rheology : an introduction to probebased active microrheology. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 :10617, 2011. 27
- [122] D. Wirtz. Particle-Tracking microrheology of living cells : Principles and applications. Annual Review of Biophysics, 38:301–326, June 2009. 27
- [123] M. Yanai, J. P. Butler, T. Suzuki, A. Kanda, M. Kurachi, H. Tashiro, and H. Sasaki. Intracellular elasticity and viscosity in the body, leading, and trailing regions of locomoting neutrophils. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 277(3):C432 –C440, 1999. 27
- [124] M. Yanai, J. P. Butler, T. Suzuki, H. Sasaki, and H. Higuchi. Regional rheological differences in locomoting neutrophils. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(3) :C603 –C611, 2004. 27
# ANNEXE **A Quelques calculs**

### **A.1** Relation entre le spectre d'une fonction et la tranformée de Laplace de cette fonction

Soit g(t) un processus stochastique stationnaire :

 $-\hat{g}(s) = \mathscr{L}\{g(t)\} = \int_0^\infty g(t)e^{-st}dt \text{ est la transformée de Laplace de } g(t)$  $-\hat{S}_g(s) = \mathscr{L}\{\langle g(t)g(t+\tau)\rangle_t\} = \int_0^\infty \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_t e^{-s\tau}d\tau \text{ est la transformée de Laplace de la fonction d'autocorrélation de } g(t).$ 

Montrons que : 
$$\hat{S}_g(s) = s \langle \hat{g}(s)^2 \rangle$$
,

où  $\langle \bullet \rangle$  désigne la moyenne d'ensemble sur plusieurs réalisations. Soit s et s' deux fréquences réelles :

$$\hat{g}(s)\hat{g}(s') = \int_0^\infty \int_0^\infty g(t)g(t')e^{-st}e^{-s't'}dtdt'$$

La valeur moyenne  $\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens}$  est définie sur une moyenne d'ensemble de N mesures telle que :

$$\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')
angle_{ens} = rac{1}{N}\sum_{i=0}^{N}\hat{g}_{i}(s)\hat{g}_{i}(s')$$

et

$$\langle g(t)g(t')\rangle_{ens} = \frac{1}{N}\sum_{i=0}^{N}g_i(t)g_i(t')$$

$$\hat{g}_i(s)\hat{g}_i(s') = \int_0^\infty \int_0^\infty dt dt' e^{-st} e^{-s't'} g_i(t)g_i(t')$$

Soit :

$$\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens} = \int_{0}^{\infty} \int_{0}^{\infty} dt dt' e^{-st} e^{-s't'} \langle g(t)g(t')\rangle_{ens}$$

On pose  $t' = t + \tau$ :

$$\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens} = \int_{0}^{\infty} e^{-(s+s')t} dt \int_{-t}^{\infty} d\tau e^{-s'\tau} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{ens}$$

On pose  $\tau = -\tau$  :

$$\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens} = \int_{0}^{\infty} e^{-(s+s')t} dt \int_{-\infty}^{t} e^{s'\tau} d\tau \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{ens}.$$
 (A.1)

En faisant l'hypothèse d'ergodocité on obtient :

$$\langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{ens} = \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_t.$$

Afin d'intégrer par partie l'équation A.1 on pose :

$$h(t) = \int_{-\infty}^{t} d\tau e^{s'\tau} \langle g(t)g(t+\tau) \rangle_{t},$$
$$\frac{dh}{dt} = e^{s'\tau} \langle g(t)g(t+\tau) \rangle_{t}.$$

Ce qui donne :

$$\begin{split} \langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens} &= \int_{0}^{\infty} e^{-(s+s')t}h(t)dt \\ &= \left[ -\frac{1}{s+s'} e^{-(s+s')t}h(t) \right]_{0}^{\infty} + \frac{1}{s+s'} \int_{0}^{\infty} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{t} e^{-s\tau}d\tau \\ &= \frac{1}{s+s'} \left( \int_{-\infty}^{0} d\tau e^{s'\tau} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{t} + \int_{0}^{\infty} d\tau e^{-s\tau} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{t} \right). \end{split}$$

On pose dans la première intégrale  $\tau = -\tau$  :

$$\langle \hat{g}(s)\hat{g}(s')\rangle_{ens} = \frac{1}{s+s'} \left( \int_{0}^{\infty} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{t} e^{-s'\tau} d\tau + \int_{0}^{\infty} \langle g(t)g(t+\tau)\rangle_{t} e^{-s\tau} d\tau \right).$$

Pour s = s' on obtient :

$$\widehat{S}_g(s) = s \langle \hat{g}(s)^2 \rangle \tag{A.2}$$

## A.2 Relation entre le spectre des vitesses et la transformée de Laplace du déplacement quadratique moyen

Soit x(t) un processus stochastique stationnaire et la vitesse  $v(t) = \frac{dx}{dt}$ :

- $\hat{S}_{v}(s) = \mathscr{L}\{\langle v(t)v(t+\tau)\rangle_{t}\} = \int_{0}^{\infty} \langle v(t)v(t+\tau)\rangle_{t} e^{-s\tau} d\tau$  est la transformée de Laplace de la fonction d'autocorrélation de la vitesse.
- $-\Delta \hat{x}^2(s) = \mathscr{L}\{\langle (x(t+\tau) x(t))^2 \rangle_t\} = \int_0^\infty \langle (x(t+\tau) x(t))^2 \rangle_t e^{-s\tau} d\tau \text{ est la transformée de Laplace du déplacement quadratique moyen de } x(t).$

Montrons que :  $2\hat{S}_{\nu}(s) = s^2 \Delta \hat{x}^2(s)$ .

Par définition du déplacement quadratique moyen on a :

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = \langle (x(t+\tau) - x(t))^2 \rangle_t = \langle (x(t) - x(t-\tau))^2 \rangle_t.$$
(A.3)

En dérivant l'équation A.3 par rapport à  $\tau$  on obtient :

$$\frac{d\langle\Delta x^2\rangle}{d\tau} = 2\langle v(t)(x(t) - x(t - \tau))\rangle_t = 2\langle v(t)\int_{t-\tau}^t v(t')dt'\rangle_t.$$
 (A.4)

On pose  $t'' = t' - t + \tau$  dans l'équation A.4 :

$$\frac{d\langle\Delta x^2\rangle}{d\tau} = 2\langle v(t) \int_0^\tau v(t'' + t - \tau) dt'' \rangle_t.$$
(A.5)

On pose ensuite  $t''' = \tau - t''$ :

$$\frac{d\langle\Delta x^2\rangle}{d\tau} = 2\langle v(t) \int_0^\tau v(t - t''') dt''' \rangle_t.$$
(A.6)

En dérivant l'équation A.6, on obtient la relation :

$$\frac{d^2 \langle \Delta x^2 \rangle}{d\tau^2} = 2 \langle v(t)v(t-\tau) \rangle_t = 2 \langle v(t+\tau)v(t) \rangle_t.$$
(A.7)

En utilisant les propriétés des transformées de Laplace<sup>1</sup> et en remarquant que  $\langle \Delta x^2(0) \rangle = 0$  et  $\frac{d\langle \Delta x^2 \rangle}{d\tau} \Big|_{\tau=0} = 0$  on trouve :

$$\boxed{2\hat{S}_{\nu}(s) = s^2 \Delta \hat{x}^2(s)} \tag{A.8}$$

1.  $\mathscr{L}\{g''\} = s^2 \mathscr{L}\{g\} - sg(0^+) - g'(0^+)$ 

# ANNEXE **B Protocoles**

# B.1 Protocoles de préparation de l'échantillon biologique

Produits nécessaires :

- Billes de silice de diamètre 1.56 µm carboxylées -COOH (BANG Laboratories, Inc)
- EDAC 1 mg/mL
- RGD (PepTide 2000, Telios Pharmaceuticals,CA, USA) solution stock à 5 mg/mL
- PBS 1X pour rinçages
- DMEM 1% BSA filtré pour saturer

### **B.1.1** Préparation des billes

Pour 2 mg de solution stock de billes à 0.1 mg/ $\mu L$  :

- prélever 1 mg de billes (=  $10 \mu L$  de la solution stock : bien vortexer)
- préparer l'EDAC : 20 mg d'EDAC dans 2 mL (= 1 mg/mL) de tampon phosphate 100 mM (soit une tablette Sigma dans 20 mL d'eau distillée)
- ajuster à pH 5 (extemporanément avec HCl 1N)
- ajouter sur le culot des billes 560  $\mu$ L d'EDAC à 1 mg/mL. L'EDAC va favoriser la liaison amide entre NH<sub>2</sub> et COOH
- ajouter le peptide RGD : 80 μL (de la solution stock à 5mg/ml DMSO), 8 μL (pour dilution RGD 1/10), 4 μL (RGD 1/20), 2 μL (RGD 1/40)
- vortexer
- agiter 2 h à température ambiante
- re-vortexer
- laver 2 fois avec du PBS (précipiter les billes par centrifugation, éliminer le surnageant, ajouter 1 mL PBS 1X, reprendre le culot)
- sur le culot des billes ajouter 1 mL d'une solution de PBS stérile
- garder la suspension au frigo 4°C.

### B.1.2 Préparation des lamelles

- travailler stérilement sous la hotte
- ajouter environ 500  $\mu$ L de fibronectine (à 5  $\mu$ g/mL dans du DMEM) sur la lamelle

- laisser 3 h à température ambiante sous la hotte
- aspirer la fibronectine, rincer la lamelle une fois avec du milieu complet
- ensemencer
- utiliser les lamelles après 24 h

### B.1.3 Adhésion des billes sur les cellules

- diluer 20 fois la solution stock de billes (annexe B.1.1) dans du milieu BSA, le jour même de l'utilisation sur les cellules : 50 µL de billes dans 950 µL de DMEM 1% BSA. La BSA va permettre de saturer les sites des groupements carboxyles -COOH n'ayant pas fait de liaisons amides et éviter les adhésions non-spécifiques entre la bille et la cellule.
- retirer le milieu et mettre la lamelle (annexe B.1.2) dans une nouvelle boîte de Petri
- bien vortexer les billes pour les séparer avant de les ajouter
- ajouter environ 50  $\mu$ L de billes (selon concentration)
- incuber 30 min à 37°C
- rincer délicatement avec du DMEM complet trois fois pour retirer les billes qui ne se sont pas accrochées
- ajouter 1.5% d'Hepes en volume (15 mM) pour maintenir le pH constant (absence de CO<sub>2</sub> dans la chambre expérimentale)

## B.2 Protocoles d'utilisation des drogues inhibant des processus dans le cytosquelette

### B.2.1 Appauvrissement de la cellule en ATP

Après avoir fait adhérer les billes, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution contenant 6 mM de deoxyglucose et 10 mM de NaN<sub>3</sub>. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu sans sérum. La chambre expérimentale est alors préparée avec du milieu sans sérum.

### B.2.2 Inhibition de la polymérisation de l'actine

Après avoir fait adhérer les billes, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution contenant 1  $\mu$ M de latrunculine A. La chambre expérimentale est ensuite préparée avec du milieu de culture et de la latrunculine A.

### B.2.3 Inhibition des myosines II

Après avoir fait adhérer les billes, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution contenant 50  $\mu$ M de blebbistatine. La chambre expérimentale est ensuite préparée avec du milieu de culture et de la blebbistatine. Un filtre rouge est ajouté au-dessus du condenseur pour éviter la photo-inactivation de la blebbistatine par la lumière bleue (488 nm) lors de l'expérience [85].

### B.2.4 Utilisation du 2,3-Butanedione monoxime (BDM)

Après avoir fait adhérer les billes, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution contenant 25 mM de BDM. La chambre expérimentale est ensuite préparée avec du milieu de culture et du BDM.

# ANNEXE C Articles

# Power spectrum of out-of-equilibrium forces in living cells : amplitude and frequency dependence

François GALLET, Delphine ARCIZET, Pierre BOHEC et Alain RICHERT *Soft Matter*, 2009, **5**, 2947-2953

Cet article présente la méthode de mesure et les premiers résultats du spectre des forces exercées sur une bille attachée au cortex d'actine par l'intermédiaire des intégrines par combinaison de microrhéologie passive et active. Les résultats présentés dans cet article sont pour l'essentiel en accord avec les résultats de ce manuscrit, notamment en ce qui concerne la mise en évidence des comportements sous-diffusif et sur-diffusif du déplacement quadratique moyen, ainsi que l'allure générale du spectre des forces actives. Cependant, les résultats préliminaires correspondant à l'effet de la déplétion de l'ATP sont en désaccord avec les mesures effectuées par la suite et présentées dans ce manuscrit. En effet, le poste expérimental utilisé pour les expériences de cet article n'était pas adapté à des mesures de fluctuations, car aux temps courts le bruit mécanique et le bruit de détection avaient une valeur comparable à l'amplitude des fluctuations de position de la bille. C'est pourquoi les valeurs du spectre de forces mesuré sur des cellules appauvries en ATP y sont surestimées. Par la suite, nous avons utilisé un poste expérimental mieux isolé et offrant une meilleure définition, ce qui a permis d'améliorer le rapport signal sur bruit pour le déplacement quadratique moyen.

# Power spectrum of out-of-equilibrium forces in living cells: amplitude and frequency dependence

François Gallet,\* Delphine Arcizet,† Pierre Bohec and Alain Richert

Received 21st January 2009, Accepted 17th April 2009 First published as an Advance Article on the web 3rd June 2009 DOI: 10.1039/b901311c

Living cells exhibit an important out-of-equilibrium mechanical activity, mainly due to the forces generated by molecular motors, acting individually or collectively on the cytoskeleton. They contribute to the fact that the fluctuation-dissipation theorem does not apply in living systems. In this work we probe the cytoskeletal out-of-equilibrium dynamics by performing simultaneous active and passive microrheology experiments, using the same micron-sized probe specifically bound to the actin cortex. The free motion of the probe exhibits a constrained, subdiffusive behavior at short time scales (t < 2s), and a directed, superdiffusive behavior at larger time scales, while, in response to a step force, its creep function presents the usual weak power law dependence with time. Combining the results of both experiments, we precisely measure for the first time the power spectrum of the force fluctuations exerted on this probe, which lies more than one order of magnitude above the spectrum expected at equilibrium, and greatly depends on frequency. We retrieve an effective temperature  $T_{eff}$  of the system, as an estimate of the departure from thermal equilibrium. This departure is especially pronounced for long time scales, where  $T_{eff}$  bears the footprint of the cooperative activity of motors pulling on the actin network. ATP depletion reduces the fluctuating force amplitude and results in a sharp decrease of  $T_{eff}$  towards equilibrium.

### Introduction

Living cells are constitutively out-of-equilibrium systems. Indeed, biological activity is characterized by constant exchanges of matter and energy with the environment, and biochemical reactions provide the power supply necessary to the metabolism. Non-equilibrium activity allows cell motion and deformation when needed for function or survival, and cargo transport within the dense microenvironment of the cell. These mechanical effects are directly related to the dynamics of polymerization/depolymerization of the cytoskeleton and to the activity of molecular motors, which convert the chemical energy stored in ATP into mechanical energy.

Consequently, the fluctuation-dissipation theorem does not apply within a living cell. The cell viscoelastic properties cannot be simply related to thermal fluctuations, but are expected to be mainly controlled by the active forces generated along the cytoskeleton. In past years, both active and passive microrheology have been used to characterize the mechanical and rheological properties within specific regions of living cells, and their implications in essential biological functions like cell adhesion and migration, or cargo transport inside the cytoplasm. These two techniques do not provide the same information.

In active microrheology, the complex viscoelastic modulus  $G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$  of the intracellular medium is determined by applying an oscillating force to a micrometric probe bound to the cytoskeleton. Experiments are driven either in the cell cortex, by using a bead specifically bound to transmembrane receptors,<sup>1-3</sup> or in the bulk cellular body,<sup>4,5</sup> using magnetic beads embedded in the cytoplasm. Alternatively, the creep function J(t) characterizes the cell response to a step of force of given amplitude.<sup>6-8</sup> Active rheology is an intrusive technique, but presents the advantage of giving direct access to the elastic and dissipative parts of the mechanical response. Most of the works report a power law dependence of the complex viscoelastic modulus with frequency, or of the creep function with time.9,10 This behavior, similar to that of crosslinked polymer networks, and of soft glassy materials, indicates that the dissipation time scales are widely and densely distributed in the system. Although it has been shown that the activity of motor proteins plays a determinant role in this mechanical response, there is yet no global model accounting for the coupling between biological activity and mechanical behavior.

By contrast, passive microrheology allows to probe different regions of the cell in a non-perturbing manner, using either endogenous granules<sup>11</sup> or submicron-sized particles embedded within the cell body.<sup>12-15</sup> Analogous experiments were performed close to the membrane, using particles specifically attached to it<sup>6,16-19</sup> or vesicles moving in the cortical region.<sup>20</sup> The mean square displacement of the particle exhibits different regimes, depending on whether the particle is constrained by the fluctuations of the network, or linked to molecular motors which impart a directed motion to it. However, it is generally not possible to deduce the rheological properties of the material from such

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 associée au CNRS et à l'Université Paris7 - Denis Diderot, Bâtiment Condorcet, Case courrier 7056, Université Paris-Diderot, 75205 Paris cedex 13, France. E-mail: francois.gallet@univ-paris-diderot.fr

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup> Present address: Center for Nanosciences (CeNS) and Faculty of Physics, Ludwig-Maximilians Universitaet, Geschwister-Scholl-Platz 1, D-80539 Muenchen, Germany

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2009

experiments, because the fluctuation-dissipation theorem does not apply in living systems. Retrieving the dissipative coefficients from the free diffusive motion of the particle would require knowing the distribution of fluctuating forces exerted on the particle. This force spectrum is related to many active physiological processes in living cell, and cannot be easily evaluated.

Recently, a combination of active and passive microrheology was performed in an *in vitro* actin gel crosslinked by biotin and neutravidin and actively stimulated by myosin motors.<sup>21</sup> A departure from equilibrium was observed over long time scales, due to active contractions in the network. In living systems, the literature concerning active and passive microrheology of the same system is scarce, and in these cases the validity of the fluctuation-dissipation theorem was not assessed.<sup>6,19</sup> The first parallel analysis of the free translational motion of a magnetic phagosome embedded in an amoeba, and of the rotation of a phagosome chain in an external magnetic field, showed a departure from equilibrium, and allowed the calculation of an effective temperature in the intracellular medium.<sup>22</sup>

This work presents the first measurements of both active and passive microrheology in a living mammalian cell, performed under strictly identical conditions with the same probe bound to the cortical actin network, in order to quantify the departure from thermal equilibrium. We use muscular cells, in which the activity of myosin molecular motors is expected to be particularly prominent. We successfully retrieve the mean square displacement of the free bead motion, and its creep function in response to an external force step applied with optical tweezers. From the two datasets we infer a numerical value for the power spectrum of active forces exerted on the bead, in the frequency range 0.01–100 Hz.

At high frequencies (s > 0.5 Hz), the force power spectrum approximately follows the same frequency dependence as an equilibrium system, but at low frequencies (s < 0.5 Hz), the force power spectrum behaves likes s<sup>-1.7</sup>, corresponding to a directed motion of the probe under cooperative action of molecular motors. In both regimes, we retrieve an effective temperature T<sub>eff</sub> higher than the actual thermodynamic temperature (from 13 to 100 times larger). T<sub>eff</sub> can be considered as a scaling for the out-of-equilibrium, frequency-dependant, biological activity. ATP depletion drastically decreases the effective temperature, supporting evidence for the active biological origin of fluctuating forces.

### Formulation of the out-of-equilibrium fluctuationdissipation theorem

The motion of a micron-sized probe embedded into a viscoelastic medium is governed by the Langevin equation, which relates the probe velocity v = dx/dt to the total force exerted on it, sum of the externally applied force  $F_{ext}$  and of the random internal fluctuating force  $F_{r}$ .<sup>13</sup>

$$m\frac{dv}{dt} + m\int_{-\infty}^{+\infty} \gamma(t-t')v(t')dt' = F_{ext}(t) + F_r(t)$$
(1)

Here m is the probe mass, and  $\gamma(t)$  a delayed friction kernel describing the viscoelastic properties of the medium. In order to respect the causality principle, one has to assign  $\gamma(t) = 0$  for t < 0. The validity of the Langevin equation does not depend on

equilibrium or out-of-equilibrium conditions. It also holds for a probe bound to the medium, partially but not necessarily fully embedded into it, provided that the probe dynamics is controlled by the mechanical properties of this medium.

In a similar way, the creep function J(t) of the system can be defined as:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} J(t - t') dF(t') = \int_{-\infty}^{+\infty} J(t - t') \frac{dF}{dt'} \bigg|_{t'} dt'$$
(2)

J(t) represents the displacement of the probe generated by a force step of magnitude unity applied at t = 0 (as for  $\gamma(t)$ , one has J(t) = 0 for t<0).

Introducing the autocorrelation functions  $S_F(t) = \langle F_r(t')F_r(t' + t) \rangle_{t'}$  and  $S_v(t) = \langle v(t')v(t' + t) \rangle_{t'}$ , and taking the Laplace transform (LT) of equation (1), one can show that:

$$\hat{S}_{v}(s) = \left(\frac{1}{m(\hat{\gamma}(s) + s)}\right)^{2} \hat{S}_{F}(s) = s^{4} (\hat{J}(s))^{2} \hat{S}_{F}(s)$$
(3)

where  $\hat{S}_v(s) = \int\limits_0^\infty S_v(t) exp(-st) dt$  and  $\hat{S}_F(s) = \int\limits_0^\infty S_F(t) exp(-st) dt$ 

are respectively the power spectra of the probe velocity and of the random force in the Laplace frequency space.

Equation (3) establishes the key relation, valid in any conditions, between the spectrum of the free velocity fluctuations in the absence of external force  $\hat{S}_v(s)$ , the mechanical response to an externally applied force  $\hat{J}(s)$ , and the spectrum of fluctuating forces  $\hat{S}_F(s)$  exerted on the probe.

In the particular case of thermal equilibrium, the usual fluctuation-dissipation theorem applies, and the force spectrum is determined by thermal fluctuations, according to:<sup>23</sup>

$$\hat{\mathbf{S}}_{\text{Feq}}(\mathbf{s}) = \frac{\mathbf{k}_{\text{B}}\mathbf{T}}{\mathbf{s}^{2}\hat{\mathbf{J}}(\mathbf{s})} \tag{4}$$

In such conditions, the fluctuation-dissipation theorem can be written in the form of the Einstein relation:

$$\hat{\mathbf{S}}_{\text{veq}}(s) = \frac{\mathbf{k}_{\text{B}} \mathbf{T}}{\mathbf{m}(\hat{\gamma}(s) + s)} \tag{5}$$

Now, in the out-of-equilibrium case, the force fluctuation spectrum is not determined by the temperature, but equation (3) remains valid. Following several authors, it may be convenient to generalize equation (4) by introducing an effective temperature for the system, defined as:

$$\hat{\mathbf{S}}_{\mathrm{F}}(\mathbf{s}) = \frac{\mathbf{k}_{\mathrm{B}} \mathbf{T}_{\mathrm{eff}}}{\mathbf{s}^{2} \hat{\mathbf{J}}(\mathbf{s})} \tag{6}$$

In other words,  $\theta(s)=\frac{T_{eff}}{T}~=~\frac{\hat{S}_F(s)}{\hat{S}_{Feq}(s)}$  may be considered as

an index of the departure from thermal equilibrium for the force power spectrum. Notice that  $T_{eff}$  is not a real thermodynamical variable in the sense that it may depend on the frequency s.

Actually, for a freely diffusing probe, the mean square displacement (MSD)  $\Delta x^2(t) = \langle (x(t') - x(t' + t))^2 \rangle_{t'}$  is a more accessible quantity than the velocity correlation function  $S_v(t) = \langle v(t)v(t + t') \rangle_{t'}$ . Both are related through  $s^2 \Delta \hat{x}^2(s) = 2\hat{S}_v(s)$  (the factor 2 comes from the definition of  $\Delta x^2(t)$ , which is not exactly

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2009

an autocorrelation function). Consequently, one can rewrite equation (3) in a form more adapted to experimental analysis:

$$\hat{S}_{F}(s) = \frac{\Delta \hat{x}^{2}(s)}{2s^{2}(\hat{J}(s))^{2}}$$
(7)

Equation (7) will be used in the next section to determine the force fluctuation spectrum  $\hat{S}_F(s)$ , from the independent measurement of  $\Delta \hat{x}^2(s)$  and  $\hat{J}(s)$  by a passive and active microrheology experiment, performed quasi-simultaneously on the same probe in identical conditions.

In the following we will encounter the situation where both the MSD and the creep function behave as power laws of time:  $\Delta x^2(t) \propto t^{\beta}$  and  $J(t) \propto t^{\alpha}$ . Then it is easy to show that the force power spectrum is expected to take the form:<sup>13</sup>

$$\hat{\mathbf{S}}_{\mathbf{F}}(\mathbf{s}) \propto \mathbf{s}^{2\alpha-\beta-1} \Leftrightarrow \langle \mathbf{F}_{\mathbf{r}}(t')\mathbf{F}_{\mathbf{r}}(t'+t) \rangle_{t'} \propto t^{\beta-2\alpha}$$
(8)

In the equilibrium case, one derives from equation (4) the additional relationship:

$$\hat{\mathbf{S}}_{\text{Feq}}(s) \propto s^{\alpha-1} \Leftrightarrow \langle \mathbf{F}_r(t')\mathbf{F}_r(t'+t) \rangle_{t'} \propto t^{-\alpha}$$
(9)

### Experimental

#### Cell culture

The myogenic cell line C2–C12 (kindly provided by M. Lambert and R. M. Mège, INSERM U440, Institut du Fer à Moulin, Paris) is a subclone of the C2 line derived from the skeletal muscle of adult CH3 mice.<sup>24</sup> Cells were grown at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>–95% air atmosphere, in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin. They were detached from culture flasks 24 hours before experiments and plated at a density of about 300 cells/mm<sup>2</sup>, in complete culture medium with serum, on glass coverslips coated with fibronectin (5 µg/mL for 3 h at room temperature).

The probes, carboxylated silica microbeads (1.56 µm diameter, Bangs Laboratories Inc.), were coated with a peptide (Peptide2000, Integra Lifescience) containing the arginineglycine-aspartic tripeptide (RGD) sequence in order to bind specifically to cortical actin, through transmembrane integrin receptors. Before use, coated beads were incubated in DMEM supplemented with 1% BSA for 30 minutes at 37 °C. Beads were then added to the cells ( $\sim 5 \,\mu g$  of beads per coverslip) and further incubated for 20 min at 37 °C. Unbound beads were washed away with medium. A closed experimental chamber was made by sealing the coverslip to a microscope slide, separated by a 100 µm plastic film spacer. The chamber was mounted on a piezoelectric stage (Polytec PI), allowing displacements in the range 0-100 Hz (maximum excursion 80 µm). The whole set up was placed on the plate of an inverted microscope (Leica DMIRB). All measurements were performed in a 37 °C thermalisation box (Life Imaging System). The total time during which the cells were studied after sealing the chamber did not exceed one hour.

ATP depletion was achieved by incubating the cells during 20-30 min in a solution containing 6 mM deoxyglucose + 10 mM NaN<sub>3</sub>, after binding the beads. Cells were then rinsed with serum deprived culture medium before sealing the chamber.

The averaged values reported in the results section refer to 60 measurements of cells in control conditions, and 23 measurements in ATP-depleted conditions.

#### Passive microrheology

The free diffusion of a bead bound to the cell was tracked with a quadrant photodiode located close to the image plane of the objective, and illuminated by the microscope bright field light (for a detailed description of the experimental set up see ref. 25). Signal amplification allowed the x and y coordinates of the bead to be in the observation plane with a resolution better than 10 nm. The bead was usually followed over 2 min. Signal acquisition at 500 Hz was achieved with LABVIEW® (National Instruments). For both coordinates x and y, the MSD  $\Delta x^2(t) = \langle (x(t') - x(t' + t))^2 \rangle_{t'}$  and its Laplace transform  $\Delta \hat{x}^2(s)$  were numerically calculated with a home made Fortran program<sup>‡</sup>.

### Active microrheology

Each active microrheology experiment was performed on the same bead immediately after its free diffusion recording, leaving not enough time between the two experiments for any remodeling of the cytoskeletal network. A force step F, either along the x or y axis, was applied to the bead at t = 0 with optical tweezers. In order to maintain the amplitude F constant, the bead tracked by the quadrant photodiode was kept at a fixed position with respect to the trap, by means of a feedback loop acting on the piezoelectric stage.<sup>25</sup> The relative bead-cell displacement x(t), equal to the stage displacement, was recorded for further analysis. The force was applied for at most 60 s, with an amplitude between 5 and 50 pN. In such conditions the bead displacement fell in the range 0.1-0.3 µm, yielding a small enough cell deformation to stay in the linear deformation regime. The creep function  $J_x(t)$  (resp.  $J_y(t)$ ) was defined as the ratio x(t)/F (resp. y(t)/F). The Laplace transforms  $\hat{J}_x(s)$  and  $\hat{J}_y(s)$  were numerically calculated as described above. We are aware that, due to the partial embedding of the bead into the cell, the retrieved x(t)results of a combination of both bead translation and bead rotation. This may induce a slight overestimate of J(t), but does not change the general conclusions of our study.

### Results

#### Mean square displacement

A typical mean square displacement curve  $\Delta x^2(t)$  is plotted in Fig. 1a, in the range 0.02–60 s, for a 1.56 µm silica bead specifically bound to the membrane of a C2–C12 cell, and linked to the actin cortical network. Also shown is the reference noise level (Fig. 1c), recorded from one of the residual beads unbound to a cell but firmly attached to the glass coverslip. The MSD curve exhibits two regimes of diffusion: a subdiffusive regime at short time scales (t < 3s), and a superdiffusive one at large time scales (t > 3s). In each regime,  $\Delta x^2(t)$  is proportional to  $t^{\beta}$ , here

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup> In a few cases (8 cells), the bead diffusion was directly recorded with a fast camera (FASTCAM 1024/500) operating at 250 Hz, and tracked using a home-made ImageJ plugin. Their MSD did not present significant differences to the one measured with the quadrant photodiode, and all the data were gathered in the same pool.



**Fig. 1** Mean square displacement (MSD)  $\Delta x^2(t)$  of a 1.56 µm silica bead specifically bound, *via* the membrane, to the actin cortex of a C2–C12 cell. (a) In a control cell, the MSD exhibits two different regimes, each characterized by a power-law t<sup>§</sup>: subdiffusion at short time scales (t < 3 s,  $\beta_1 = 0.1$ ), corresponding to a constrained motion of the bead, and superdiffusion at large time scales (t > 3 s,  $\beta_2 = 1.7$ ), corresponding to a directed drift motion. (b) In an ATP-depleted cell, the MSD amplitude is lower and the bead motion remains subdiffusive even above t = 10s. (c) Noise ground level, recorded from a bead stuck to the glass coverslip. Insert: bead trajectory in the x-y plane, associated to curve (a).

with  $\beta_1 = 0.1$  and  $\beta_2 = 1.7$ , respectively in the sub- and superdiffusive case. A similar behavior is observed for all the studied cells, with  $\langle \beta_1 \rangle = 0.12 \pm 0.01$  and  $\langle \beta_2 \rangle = 1.49 \pm 0.06$ , respectively in the range 0.02 < t < 0.5 s and t > 10 s (n = 60). The sub-and super-diffusive regimes respectively correspond to a constrained motion of the bead at short time scales, combined with a directed drift motion at longer time scales, as clearly visible on the x-y trajectory. This is consistent with other reports concerning freely diffusing particles, either embedded within the cell, or bound to its membrane.<sup>6,9,13,15-18</sup> The crossover between the two regimes occurs on average at t  $\approx 2$  s.

ATP depletion noticeably modifies the free diffusion behavior, as illustrated in Fig. 1b. First, the global amplitude of the mean square displacement is reduced as compared to control conditions, by a factor of 1.5 to 10, which is not uniform over the whole time range. The subdiffusive behavior is still observable at short time scales, but about half of the cells do not exhibit superdiffusion at large time scales any more. This is a strong evidence that, in control conditions, the diffusive motion is largely due to non-equilibrium forces generated by the biological activity. On average, both exponents  $\beta_1$  and  $\beta_2$  are reduced, becoming:  $<\beta_1> = 0.06 \pm 0.01$  and  $<\beta_2> = 1.27 \pm 0.13$  (n = 23). Whenever it can be measured, the crossover time between the subdiffusive and superdiffusive regime is roughly unchanged, around 3 s.

#### **Creep function**

Fig. 2 shows an example of creep response for a bead bound to a cell membrane and submitted to a force step. Like in most of

the experiments reported in the literature,<sup>7,8</sup> the creep function J(t) = x(t)/F exhibits a power law behavior over the full time range 0.02–30 s. In Fig. 2, the best power law fit  $J(t) = A(t/t_0)^{\alpha}$  yields  $\alpha = 0.25$ . Over 60 measurements,  $\alpha$  is distributed in the range 0.05–0.4, and its average value is  $\langle \alpha \rangle = 0.183 \pm 0.015$ . This is consistent with previous experiments on the same cell line: for cells submitted to uniaxial stretching, J(t) was shown to be accurately described by a power law, with an average value of 0.24 for the exponent  $\alpha$ .<sup>7</sup> The origin of such power law behavior, thoroughly discussed elsewhere,<sup>6,10</sup> is related to the wide and dense distribution of response times in the system, spreading over several orders of magnitude.

For ATP-depleted cells, we observe a similar power behavior for the creep function, but the exponent  $\alpha$  is slightly smaller:  $\langle \alpha \rangle = 0.139 \pm 0.015$  (n = 23). Considering that  $\alpha$  reflects the more elastic-like or dissipative-like character of the medium (see ref. 3 and 10), this value, smaller than in control conditions, means that ATP depletion reduces the efficiency of the dissipative processes, and brings the cell closer to a rigid elastic solid. This is consistent with the picture that ATP depletion inhibits molecular motors activity and make the myosin heads bind to the actin filaments (rigor state), thus increasing the number of rigid crosslinks in the network.

### Force power spectrum

The power spectrum of fluctuating forces  $\hat{S}_{F}(s)$  exerted on the probe is inferred from the combination of passive and active microrheology experiments performed on the same probe (see eqn (7)). The mean spectrum  $\hat{S}_{F}(s)$ , geometrically averaged over 60 measurements for cells in control conditions, is plotted on Fig. 3 (open circles). Together is also plotted the mean force spectrum  $\hat{S}_{Feq}(s)$ , calculated according to eqn (4) as if the system was in equilibrium. The actual power spectrum is always above the equilibrium one, over the full frequency ranges = 0.05–50 Hz. This demonstrates the active origin of biological forces



Fig. 2 Creep function J(t) of a bead bound to the cell membrane, in response to a force step. J(t) behaves as a weak power law over the full time range 0.02–30 s. The best power law fit  $J(t) = A(t/t_0)^{\alpha}$  leads to  $\alpha = 0.25$ . The average value over 60 measurements is  $\langle \alpha \rangle = 0.180 \pm 0.015$ .

transmitted to the bead. A closer look at the active spectrum indicates the coexistence of two distinct power law behaviors  $\hat{\mathbf{S}}_{\mathbf{F}}(s) \propto s^{\gamma}$  according to the frequency. At high frequencies s > 0.5Hz (i.e. short time scale) the exponent value  $\gamma_2=-0.8$  is in agreement with the expected one  $\gamma = 2 < \alpha > - < \beta_1 > -1 = -0.75$ (see equation (8)). Interestingly, one notices that  $\gamma_2$  is also identical to the exponent  $\gamma_e = -0.8$  measured on the equilibrium spectrum  $S_{Feq}(s)$ . Thus, the actual force spectrum in this frequency range exhibits almost the same frequency dependence as the equilibrium one, although the prefactor is different: the ratio  $\hat{S}_{F}(s)/\hat{S}_{Feq}(s)$  is here about 13. At lower frequencies s < 0.5Hz (i.e. larger time scales), the exponent of the power spectrum is shifted to  $\gamma_1 = -1.7$ , and the ratio  $\hat{S}_F(s)/\hat{S}_{Feq}(s)$  rapidly increases with decreasing s. In this range the departure from equilibrium increases with time. The crossover at s  $\approx$  0.5 Hz (t  $\approx$  2 s) corresponds to the transition between the subdiffusive and the superdiffusive regimes observed during free particle motion. We have also plotted on Fig. 3 the mean force spectra  $\hat{S}_{F}(s)$ , for ATP depleted cells, and  $\hat{S}_{Feq}(s)$  calculated as if the cells were at equilibrium (full triangles). The data are averaged over 23 measurements. Focusing only on their frequency dependence,  $\hat{S}_{F}(s)$  and  $\hat{S}_{Feq}(s)$  show similar behavior as the corresponding curves obtained in control conditions, except at small frequencies (large time scale), where the spectrum  $\hat{S}_{F}(s)$  of ATP cells diverges from the spectrum of control cells. In a second step, one observes that the averaged active force spectrum  $\hat{S}_{F}(s)$  is lower for ATP



Fig. 3 Laplace transform  $\hat{S}_F(s)$  of the force-force correlation function, yielding the mean power spectrum of the fluctuating forces exerted on the probe (—), and the spectrum  $\hat{S}_{Feq}(s)$ , calculated as if the system was at equilibrium (---). For cells in control conditions ( $\bigcirc$ ), we distinguish two different regimes, expressed as frequency power laws  $\hat{S}_F(s) \propto s^{\gamma}$ . At high frequencies (s > 0.5 Hz) the exponent  $\gamma_2 = -0.8$  is equal to the exponent  $\gamma_e$  retrieved from  $\hat{S}_{Feq}(s)$ , but the ratio  $\theta_C = \hat{S}_F(s)/\hat{S}_{Feq}(s) \approx 13$ . At lower frequencies (s < 0.5 Hz), the exponent is shifted to  $\gamma_1 = -1.7$ , and  $\theta_C$  rapidly increases with decreasing s. The crossover at s ≈ 0.5 Hz (t ≈ 2 s) corresponds to the transition between the subdiffusive and the superdiffusive regimes observed during free particle motion. For ATP depleted cells (▲), the frequency dependences are similar (except at low frequency) but the ratio  $\theta_A$  is smaller than in control conditions. The curves represent averaged values over 60 measurements (control conditions) or 23 measurements (ATP depleted cells).



**Fig. 4** Plots of  $\theta(s) = T_{eff}/T$ , the ratio of the effective temperature of the system to the bath temperature, *versus* frequency. Upper curve: control cells (60 measurements); lower curve: ATP-depleted cells (23 measurements). In control conditions,  $\theta(s)$  remains constant, close to 13, for s > 0.5 Hz, and rapidly increases as s decreases below 0.5 Hz. For ATP-deprived cells,  $\theta(s)$  is substantially lowered, indicating that ATP depletion considerably reduces the active part of force fluctuations and brings the cells back closer to equilibrium conditions. At high frequency,  $\theta(s)$  is constant, around 6 (2 times smaller than in control cells); at lower frequency, although  $\theta(s)$  slightly increases with decreasing s, it is reduced by a factor of up to 10 compared to controlled conditions.

depleted cells than for control cells, while the equilibrium spectrum  $\hat{S}_{Feq}(s)$  is slightly larger.

The effective temperature (see equation (6)) is perhaps a more convenient parameter for visualizing the out-of-equilibrium conditions of the system. The average index  $\theta(s) = T_{eff}/T = \hat{S}_F(s)/t$  $\hat{S}_{Feq}(s)$ , which quantifies the departure from equilibrium, is plotted as a function of the frequency in Fig. 4 for control and ATP-depleted cells. In control conditions,  $\theta_{C}(s)$  remains constant, close to 13, for s > 0.5 Hz, and rapidly increases as s decreases below 0.5 Hz, which is consistent with Fig. 3. This approach using the effective temperature is guite adapted to show up the prominent effect of ATP depletion. As compared to control conditions,  $\theta_A(s)$  is substantially lowered for ATPdeprived cells, indicating that ATP depletion significantly reduces the active part of force fluctuations and brings back the cells closer to equilibrium conditions. At high frequency,  $\theta_A(s)$  is also constant, with a mean value of about 6 instead of 13 for control cells; at lower frequency,  $\theta_A(s)$  is reduced by a factor up to 10 and does not show a large increase with decreasing s anymore. Although noticeably smaller than in the presence of ATP,  $\theta_A(s)$  never reaches the value  $\theta_A(s) = 1$  expected at thermodynamical equilibrium.

### Discussion

By performing active and passive microrheology on the same micron-sized probe bound to the cell membrane, we were able to infer the precise amplitude and frequency dependence of the fluctuating forces spectrum exerted on this probe, bringing evidence that these forces are generated by active, out-of-equilibrium, biological processes. Several active mechanisms are likely to contribute to the force generation, and, at this stage, it is not trivial to unambiguously determine which one dominates.

This journal is  $\ensuremath{\mathbb{C}}$  The Royal Society of Chemistry 2009

Indeed, the bead is linked to the cortical actin network through transmembrane receptors, and both active processes in the actin cortex and at the bead-cell contact may contribute to generate forces on the bead. Clearly, the free diffusion of the bead can be affected by local remodeling of the bonds in the contact area. However, it is reasonable to assume that the motion of the bead is mainly due to the activity of molecular motors, namely myosins, pulling on these filaments. This is supported by the observation that the typical time scale for contact remodeling is larger than 1 min, which is beyond our experimental time range.<sup>19,25</sup> Also, the force spectrum at low frequency exactly matches the superdiffusive regime of the particle motion, and this directed motion is known to be generated by myosin activity, which imprints a retrograde flow to actin filaments. Finally, preliminary experiments performed on cells treated with blebbistatin show that the force power spectrum is lowered to a level comparable to ATP-depleted cells when the myosin II activity is inhibited (data not shown). But we cannot yet completely rule out the possibility that other molecular motors partially contribute to the force spectrum. The results of previous works<sup>14,22</sup> suggested that a large part of the active fluctuations in the bulk intracellular medium was due to active gliding along the microtubule network. However, our experiment is probably less sensitive to such processes, because it is performed in the cortical region, and also because the probes are not directly linked to the microtubule network.

As suggested in a recent theoretical work,<sup>26</sup> the mechanism responsible for the bead motion can be depicted as follows: on short enough time scales, random binding and unbinding of individual myosin heads generates random forces on the filaments, while at longer time scales cooperative effects dominates to pull on the network and imprint a directed and centripetal motion to the bead. In the higher frequency regime s > 0.5 Hz, corresponding to shorter time scales t < 2 s, we observe that the spectrum has nearly the same frequency dependence as the equilibrium one, but its amplitude is larger by more than one order of magnitude. More precisely, the spectrum in this range can be approximated by  $\hat{S}_{F}(s) \approx 9 \text{ s}^{-0.8} \text{ pN}^{2} \cdot \text{s}$ . By taking the inverse Laplace transform, this leads to the expression of the force autocorrelation function  $\langle F_r(t')F_r(t' + t) \rangle_{t'} \approx 8 t^{-0.2} pN^2$ . One notices that the amplitude of this function, a few square piconewtons, is comparable to that of a single myosin motor. This supports the idea that, in this time range, the bead fluctuations are generated by molecular motors working independently. On the contrary, at lower frequencies, the spectrum takes the form  $\hat{S}_{F}(s) \approx 4 s^{-1.7} pN^2 \cdot s$ . The exponent  $\gamma_1 = -1.7$  is reasonably close to the value  $\gamma = -2$  suggested for the first time by Lau *et al.* for the spectrum frequency dependence.13 In the real time space, this corresponds to  $\langle F_r(t')F_r(t' + t) \rangle_{t'} \approx 5 t^{0.7} pN^2$ . The force-force autocorrelation function thus increases almost linearly with elapsed time, which can be explained only if the mean force exerted on the bead does not average to zero. This is consistent with the picture that, over long time, the bead is driven by a centripetal force generating its directed motion. Incidentally, we recall that the amplitude of the force power spectrum is always larger than the equilibrium one, over the full explored time range. This differs from the observations reported in active in vitro gels,21 and in TC7 epithelial cells,9 where the force spectrum was found identical to the equilibrium one at short time scale.

The effective temperature index  $\theta = T_{eff}/T$  is a convenient parameter to visualize the departure from equilibrium, although its interpretation as a true thermodynamical variable is not a trivial problem.<sup>27–29</sup> In Fig. 4, the two plots of  $\theta(s)$  enlighten the contribution of active processes in force generation, and make the comparison easier between normal and ATP-depleted cells. Interestingly, the important decrease of  $\theta(s)$  in ATP-depleted conditions does not appear homogeneous over the full frequency range. In particular, the disappearance of the sharp increase of  $\theta(s)$  at low frequencies is correlated to the absence of directed motion observed for a large fraction of the beads at large time: on average, the drift velocity of the bead is reduced from  $0.22 \pm 0.03 \mu m/min$  in normal conditions to  $0.12 \pm 0.02 \mu m/min$ in ATP-depleted conditions.

Surprisingly, for ATP-depleted cells, the effective temperature index  $\theta(s)$  is reduced but never reaches the equilibrium value  $\theta(s)$ = 1, while one would expect ATP depletion to block all active processes, and to lead back to equilibrium conditions. Several reasons can be invoked to interpret this: (i) ATP depletion may not be completely achieved in our experimental conditions. This is supported by the observation of a retrograde motion for a fraction of treated cells; (ii) other active processes, for instance microtubule dynamics which is GTP-dependant, may not be affected, or only partially affected by ATP depletion; (iii) remodeling of the network due to binding/unbinding of crosslinkers may be sufficient to induce some glassiness in the system, even in the absence of active agents.

In conclusion, we report here a direct and quantitative characterization of the out-of-equilibrium mechanical activity in a living cell. Combining active and passive microrheology experiments performed at the same time, with the same probe, allowed retrieving the power spectrum of fluctuating forces generated by biological activity, which does not verify the usual fluctuation-dissipation theorem. We were able to precisely measure the amplitude and the time dependence of the force autocorrelation function, and to relate them to the forces generated by molecular motors, acting either individually at short time scale, or cooperatively at larger one. We quantitatively measured how ATP depletion induces a spectacular decrease of the force power spectrum towards its equilibrium value. Specific inhibition of myosin II activity is expected to confirm the dominant contribution of these molecular motors to the active processes in the cortical region. A better link between theoretical models, in vitro studies using active polymer networks, and in vivo experiments is still needed, but this study is an important step in this direction: it describes precisely and quantitatively the out-of-equilibrium force generation that governs cell mechanical behavior.

### Acknowledgements

The authors acknowledge Noëlle Pottier, Claire Wilhelm, Damien Robert and Jean-Pierre Henry for interesting discussions, Sylvie Hénon for her help in handling the experiment, and Olivier Cardoso for assistance in bead tracking. This work was partly supported by a grant from "Association pour la Recherche sur le Cancer" (subvention libre # 3115). The biophysics group in MSC is also affiliated to the CNRS Consortium Cell Tiss (GDR 3070).

### References

- 1 B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas and J. J. Fredberg, Scaling the microrheology of living cells, *Physical Review Letters*, 2001, 8714(14), 4.
- 2 M. Balland, A. Richert and F. Gallet, The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2005, 34(3), 255–261.
- 3 B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet and J. J. Fredberg, Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells, *Physical Review E*, 2003, **68**(4), 18.
- 4 A. R. Bausch, W. Moller and E. Sackmann, Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers, *Biophysical Journal*, 1999, **76**(1), 573–579.
- 5 C. Wilhelm, F. Gazeau and J. C. Bacri, Rotational magnetic endosome microrheology: viscoelastic architecture inside living cells, *Physical Review E*, 2003, 67(6), 12.
- 6 P. Bursac, G. Lenormand, B. Fabry, M. Oliver, D. A. Weitz, V. Viasnoff, J. P. Butler and J. J. Fredberg, Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell, *Nature Materials*, 2005, 4(7), 557–561.
- 7 N. Desprat, A. Richert, J. Simeon and A. Asnacios, Creep function of a single living cell, *Biophysical Journal*, 2005, 88(3), 2224–2233.
- 8 G. Lenormand, E. Millet, B. Fabry, J. P. Butler and J. J. Fredberg, Linearity and time-scale invariance of the creep function in living cells, *Journal of the Royal Society Interface*, 2004, 1(1), 91–97.
- 9 B. D. Hoffman, G. Massiera, K. M. Van Citters and J. C. Crocker, The consensus mechanics of cultured mammalian cells, *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, **103**(27), 10259–10264.
- 10 M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon and F. Gallet, Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling, *Physical Review E*, 2006, **74**(2), 021911.
- 11 S. Yamada, D. Wirtz and S. C. Kuo, Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology, *Biophysical Journal*, 2000, **78**(4), 1736–1747.
- 12 Y. Tseng, T. P. Kole and D. Wirtz, Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology, *Biophysical Journal*, 2002, **83**(6), 3162–3176.
- 13 A. W. C. Lau, B. D. Hoffman, A. Davies, J. C. Crocker and T. C. Lubensky, Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells, *Physical Review Letters*, 2003, **91**(19), 198101.
- 14 A. Caspi, R. Granek and M. Elbaum, Diffusion and directed motion in cellular transport, *Physical Review E*, 2002, **66**(1).

- 15 D. Weihs, T. G. Mason and M. A. Teitell, Bio-microrheology: a frontier in microrheology, *Biophysical Journal*, 2006, **91**(11), 4296–4305.
- 16 C. Raupach, D. P. Zitterbart, C. T. Mierke, C. Metzner, F. A. Müller and B. Fabry, Stress fluctuations and motion of cytoskeletal-bound markers, *Physical Review E*, 2007, 76(1).
- 17 P. Bursac, B. Fabry, X. Trepat, G. Lenormand, J. P. Butler, N. Wang, J. J. Fredberg and S. S. An, Cytoskeleton dynamics: fluctuations within the network, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355(2), 324–330.
- 18 X. Trepat, L. Deng, S. S. An, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, W. T. Gerthoffer, J. P. Butler and J. J. Fredberg, Universal physical responses to stretch in the living cell, *Nature*, 2007, 447(7144), 592.
- 19 G. Massiera, K. M. Van Citters, P. L. Biancaniello and J. C. Crocker, Mechanics of single cells: rheology, time depndence, and fluctuations, *Biophysical Journal*, 2007, **93**(10), 3703–3713.
- 20 S. Huet, E. Karatekin, V. S. Tran, I. Fanget, S. Cribier and J. P. Henry, Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics, *Biophysical Journal*, 2006, 91, 3542–3559.
- 21 D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt and F. C. MacKintosh, Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks, *Science*, 2007, **315**(5810), 370–373.
- 22 C. Wilhelm, Out-of-equilibrium microrheology inside living cells, *Physical Review Letters*, 2008, **101**(2).
- 23 T. G. Mason and D. A. Weitz, Optical measurements of frequencydependent linear viscoelastic moduli of complex fluids, *Physical Review Letters*, 1995, 74(7), 1250–1253.
- 24 J. P. Changeux, C. Pinset and A. B. Ribera, Effects of chloroprpmazine and phencyclidine on mouse C2 acetycholinrreceptor kinetics, *Journal of Physiology-London*, 1986, **378**, 497– 513.
- 25 D. Icard-Arcizet, O. Cardoso, A. Richert and S. Henon, Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment, *Biophysical Journal*, 2008, 94(7), 2906–2913.
- 26 C. Metzner, C. Raupach, D. P. Zitterbart and B. Fabry, Simple model of cytoskeletal fluctuations, *Physical Review E*, 2007, 76(2).
- 27 B. Abou and F. Gallet, Probing a nonequilibrium Einstein relation in an aging colloidal glass, *Physical Review Letters*, 2004, 93(16), 4.
- 28 L. F. Cugliandolo, J. Kurchan and L. Peliti, Energy flow, partial equilibration, and effective temperatures in systems with slow dynamics, *Physical Review E*, 1997, 55(4), 3898–3914.
- 29 N. Pottier, Out of equilibrium generalized Stokes-Einstein relation: determination of the effective temperature of an aging medium, *Physica A*, 2005, **345**, 472–484.